



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

RIINA JUKOLA

DNA-PEPTIDI NANOPARTIKKELEIDEN MUODOSTUMISEN TUT-
KIMINEN AIKAEROTTEISEN FLUORESENSSISPEKTROSKOPIAN
AVULLA

Diplomityö

Tarkastajat: professori Helge Lem-
metyinen ja lehtori Elina Vuorimaa-
Laukkanen

Tarkastajat ja aihe hyväksytty
Teknisiuonnontieteellisen tiedekun-
taneuvoston kokouksessa 5. maa-
liskuuta 2014

TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknisluonnontieteellinen koulutusohjelma

JUKOLA, RIINA: DNA-peptidi nanopartikkeleiden muodostumisen tutkiminen aikaerotteisen fluoresenssispektroskopian avulla

Diplomityö, 41 sivua

Elokuu 2014

Pääaine: Kemia

Tarkastajat: professori Helge Lemmetyinen ja lehtori Elina Vuorimaa-Laukkanen

Avainsanat: Aikaerotteinen fluoresenssispektroskopia, DNA, fluoresenssi, geenihoito, geeninsiirto, kooperatiivinen sitoutuminen, nanopartikkeli, peptidi

Geenihoito on lupaava tulevaisuuden hoitomuoto. Geenihoito perustuu viallisen geenin korvaamiseen vastaavalla terveellä geenillä. Jo toteutuneissa geenihoidoissa korvaavat geenit on pääosin kuljetettu kohdesoluun viruksien avulla, mutta geeninsiirtoa DNA-pohjaisilla partikkeleilla tutkitaan lisääntyvässä määrin. Geeninsiirtoon kuuluu monia vaiheita: DNA sitoutuu kationiseen kuljettaja-aineeseen, kulkeutuu soluun, vapautuu kuljettaja-aineesta ja kulkeutuu tumaan. Kationisten polymeerien ja peptidien geeninsiirtoa on tutkittu soluissa transfektiokokeilla, mutta menetelmä on kallis ja hidas. Fluoresenssispektroskopian avulla voidaan tutkia DNA:n sitoutumista partikkeleiksi, eli geeninsiirron ensimmäistä vaihetta tehokkaammin.

Fluoresenssispektroskopiset tutkimukset perustuvat fluoresoivien yhdisteiden, tässä työssä etidiumbromidin käyttöön fluoresoivana merkkiaineena. Kun etidiumbromidi sitoutuu DNA:n fosfaattiryhmiin, sen fluoresenssin elinaika muuttuu. Liuoksessa läsnä oleva kationinen polymeeri tai peptidi sitoutuu DNA:han ja etidiumbromidi irtoaa. Kuljettaja-aineeseen sitoutuneen DNA:n määrää voidaan tutkia määrittämällä missä suhteessa liuoksessa olevasta etidiumbromidista on vapaana tai sitoutunut DNA:han. Tämän lisäksi työssä on esitetty kaksi erilaista tapaa mallintaa sitoutumista.

Työssä keskityttiin peptidin $(KK)_2KGGC$ ja DNA:n keskinäiseen sitoutumiseen. Mittauksia tehtiin kolmessa eri puskuriliuoksessa ja kahdella eri pH-arvolla. Työssä määritettiin myös DNA-peptidipartikkelien kokoja eri DNA-peptidi-suhteilla. Partikkelien koon havaittiin kasvavan peptidilisäyksen funktiona, kunnes lähes kaikki DNA:n fosfaattiryhmät olivat sitoutuneet. Ylimääräpeptidi puolestaan pienensi partikkelikokoa.

Happamammissa olosuhteissa peptidi sitoi tehokkaammin DNA:ta, mutta myös puskurien välillä oli eroa samassa pH-arvossa. Vaikuttaa siltä, että puskurin ionivahvuudella on suuri merkitys DNA-peptidipartikkelin muodostumiseen. Matalammassa ionivahvuudessa DNA-peptidipartikkelin sitoutuminen oli positiivisesti kooperatiivista, eli ensimmäinen sitoutunut peptidin aminoryhmä edesauttoi seuraavien sitoutumista. Vahvemmassa ionivahvuudessa sitoutuminen oli alkuun riippumatonta ja positiivisesti kooperatiivista vasta kun peptidin konsentraatio oli riittävän korkea.

ABSTRACT

TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Master's Degree Programme in Science and bioengineering

JUKOLA, RIINA: Study of the formation of DNA-peptide nanoparticles by time-correlated fluorescence spectroscopy

Master of Science Thesis, 41 pages

August 2014

Major: Chemistry

Examiners: Professor Helge Lemmetyinen and University Lecturer Elina Vuorimaa-Laukkanen

Keywords: DNA, fluorescence, gene therapy, gene transfer, cooperative binding, nanoparticle, peptide, time-correlated fluorescence spectroscopy

Gene therapy is a promising technology for curing diseases caused by defective genes. Traditionally a healthy gene is transferred using viral vectors, but a new method utilizes cationic polymers and peptides to complex DNA and deliver DNA to cells. Cellular studies are expensive and slow, but the method based on time-resolved fluorescence spectroscopy utilized in this study makes it possible study the first stage of the gene delivery faster and cheaper than traditional methods.

Ethidium bromide (ETI) is used as probe in the measurements. ETI binds to DNA's phosphate groups. When cationic peptide or polymer complex DNA ETI is freed to the bulk solution. Simultaneously the fluorescence lifetime of ETI decreases. Since the relative amount of free ETI is directly proportional to the amount of formed complexes, the formation of DNA:peptide complexes can be monitored. The obtained results are analyzed with both the independent and the cooperative binding models.

The focus of this thesis is to study the binding of peptide (KK)₂KGGC and DNA. Three different buffers with two different pHs were used for the study. Additionally, sizes of the peptide-DNA particles were measured. Particle size increased as a function of added peptide, until almost all phosphate groups of DNA were bound. On the other hand, increased amount of the peptide decreased the particle size.

Peptide bound to DNA more effectively in acidic solutions; however other properties of the buffer affected the binding reaction. It seems that when the ionic strength is lower, binding of the peptide and DNA is positively cooperative, thus the first bound aminogroup of a peptide makes it easier for other aminogroups to bind. If the ionic strength is higher the binding is independent at low peptide-DNA ratios and positively cooperative only when the peptide concentration is high enough.

ALKUSANAT

Tämä diplomityö tehtiin Tampereen teknillisellä yliopistolla kemian ja biotekniikan laitoksella. Mittauksia suoritettiin myös Helsingin yliopiston lääketutkimuksen keskuksessa. Haluan kiittää ohjaajiani, FT Elina Vuorimaa-Laukkasta ja professori Helge Lemmetyistä työmahdollisuuden tarjoamisesta ja työn tarkastuksesta.

Erityisesti Elina Vuorimaa-Laukkanen ansaitsee erittäin suuret kiitokset esimerkillisestä ja kärsivällisestä ohjauksesta. Suuret kiitokset Tiia Ketolalle loputtomasta tuesta sekä työn taustalla olevan teorian selvittämisestä. Kiitokset myös Manuela Raviñalle avusta mittauksissa Helsingin yliopistolla. Kiitokset koko TTY:n kemian laboratorion välle iloisen, avoimen ja viihtyisän ilmapiirin luomisesta.

Haluan kiittää myös läheisiäni tuesta työn kuluessa. Kiitokset Maritalle työn kommentoinnista sen jokaisessa vaiheessa. Kiitos Katariinalle, joka piti minut järjissäni ja kiinni todellisessa maailmassa. Kiitos perheelle ja muille ystäville kannustuksesta. Erityisesti kiitos Antille kaikesta. Tietysti, kiitos Nestorille! Kiitos olemassaolostasi ja siitä, että opetat mikä elämässä on tärkeää.

Tampere, 28. heinäkuuta 2014

Riina Jukola

SISÄLLYS

1	Johdanto	1
2	Teoreettinen tausta	3
2.1	DNA:n kuljettaja	3
2.2	Fluoresenssi	7
2.3	Kompleksien muodostuminen	10
2.4	Sitoutumisvakiot	12
3	Materiaalit ja menetelmät	17
3.1	Työssä käytetyt yhdisteet	17
3.2	Puskurien ionivahvuus	19
3.2.1	MES-HEPES-puskurien ionivahvuudet	19
3.2.2	NaAc puskurin ionivahvuus	23
3.3	Näytteiden valmistus	24
3.4	Kokeelliset menetelmät	24
4	Tulokset	28
4.1	Komponenttisperitrit	28
4.2	Peptidin amiiniryhmiin sitoutuneen DNA:n osuus	29
4.3	DNA-peptidipartikkelin koko	30
4.4	Sitoutumisvakiot	32
5	Tulosten tarkastelu	36
6	Yhteenveto ja johtopäätökset	38
	Lähteet	39

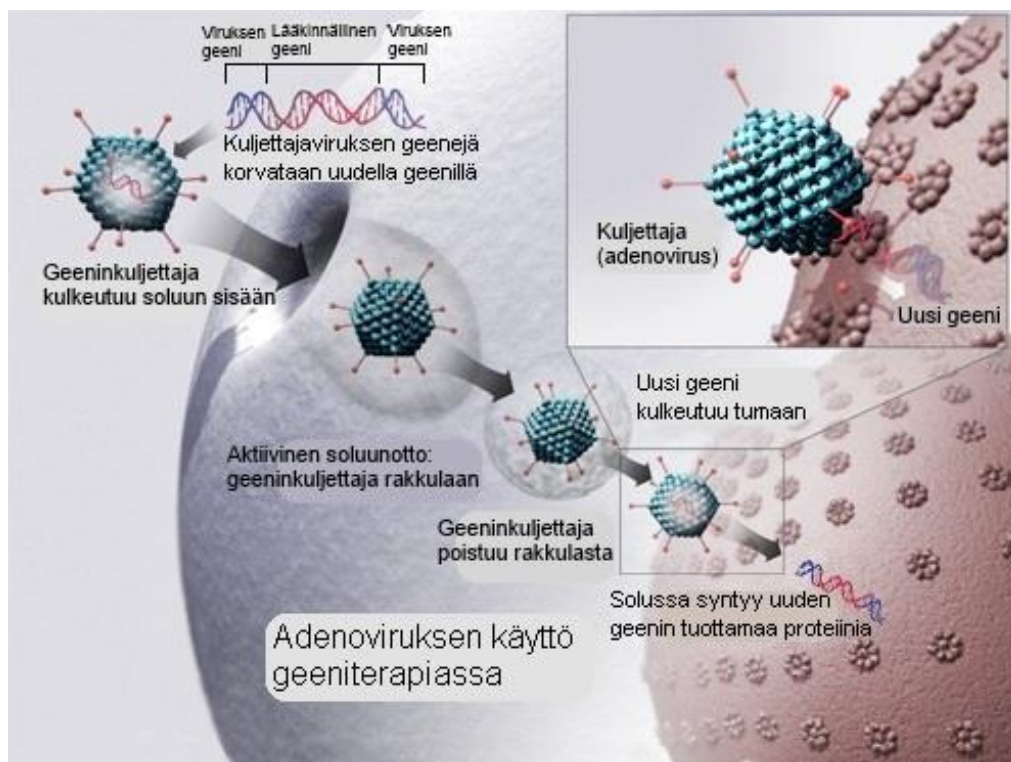
TERMIT JA NIIDEN MÄÄRITELMÄT

$a_i(\lambda)$	Aallonpituudesta riippuva pre-eksponentiaalikerroin, amplitudi
α	Hill'n kooperatiivisuustekijä
B	Sitoutuneen DNA:n osuus
C	Kysteiini
CFD	Diskriminaattori (engl. constant fraction discriminator)
d_H	Hydrodynaaminen halkaisija
DAS-kuvaaja	Komponenttispektri, amplitudit $a_i(\lambda)$ aallonpituuden funktiona (engl. decay associated spectra)
DNA	Deoksiribonukleiinihappo (engl. deoxyribonucleic acid)
DLS	Valon sirontaan perustuva partikkelikokomittaustekniikka (engl. dynamic light scattering)
ETI	Etidiumbromidi
G	Glysiini, aminohappo
HAc	Etikkahappo, CH_3COOH
HEPES	N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo
<i>in vivo</i>	Elävässä organismissa tehty tutkimus
K	Lysiini
K_{ko}	Kooperatiivisen teorian mukainen sitoutumisvakio amiiniryhmää kohti
K_r	Riippumattoman teorian mukainen sitoutumisvakio amiiniryhmää kohti
λ	Aallonpituus
MES	2-(N-morfoliini)etaanisulfonihappo
N/P -suhde	Peptidin aminoryhmäkonsentraation suhde DNA:n fosfaattiryhmäkonsentraatioon
NaAc	Natriumasetaatti, CH_3COONa
Nanopartikkeli	Halkaisijaltaan 1–100 nm:n hiukkanen
MCA	Monikanava-analysaattori (engl. multichannel analyser)
PM	Valomonistinputki (engl. photomultiplier tube)
τ	Fluoresenssin elinaika
TAC	Aika-amplitudimuunnin (engl. time-to-amplitude converter)
TCSPC	Aikaerotteinen yksittäisfotonilaskija (engl. time-correlating single photon counting)
Φ	Fluoresenssin kvanttisuhde

1 JOHDANTO

Perinteisen lääkehoidon rinnalle on kehitelty geenihoitoa. Geenihoito perustuu sairauden aiheuttavan viallisen geenin version eli alleelin korvaamiseen vastaavalla normaalilla geenillä. Jos sairauden aiheuttaa yksi mutatoitunut geeni, sairauden hoitaminen on teoriassa helppoa. Käytännössä geenihoidoilla on jo parannettu sairauksia ja vaivoja, mutta vielä on voitettava monia haasteita, ennen kuin geeniterapiasta voi tulla yleinen hoitomuoto. Geenihoitoja voidaan käyttää kahdella tavalla. Jos kyseessä oleva kudos on sellainen, mitä voidaan käsitellä ihmisen ulkopuolella (esimerkiksi verisolut), voidaan soluihin laittaa haluttu geeni laboratoriossa ja palauttaa solut elimistöön. Jos taas kyseessä on kudos, jota ei voida käsitellä elimistön ulkopuolella, kuten esimerkiksi hermosolut, solut on hoidettava elimistössä (*in vivo*). Yksi elimistössä tapahtuvan hoidon suurimmista haasteista on sopivan geeninkuljettajan löytäminen. *In vivo* -hoidoissa tarvitaan sellaisia geeninkuljettajia, jotka pystyvät kuljettamaan geenin tarkalleen oikeisiin kohdesoluihin. (Kobayashi et al. 2005, s. 306; Fitzgerald-Hayes et al. 2009, s. 244).

Suurin osa tämänhetkisistä *in vivo* -geenihoidoista tehdään virusperäisillä kuljettajilla, esimerkiksi adenoviruksella (Kuva 1.1.).



Kuva 1.1. Adenoviruksen käyttö geenihoidossa.

Virusperäisissä menetelmissä ainakin yksi kuljettajaviruksen geeneistä on korvattu lääkinnällisellä geenillä. (Wagner 1999, s. 279–280). Koeputkessa virusperäiset kuljettajat ovat erittäin tehokkaita, mutta kliinisissä kokeissa on havaittu useita ongelmia, kuten virusperäisten kuljettajien myrkyllisyys, immunogeenisyys eli vaikutus elimistön puolustusjärjestelmään, tulehduksia aiheuttavat ominaisuudet, kuljetettavan DNA:n rajallinen koko, pakkaus- ja tuottamisongelmat sekä korkea hinta. Tämän takia virusperäisille kuljettajille etsitään vaihtoehtoja yhä enenemässä määrin. (Lee et al. 2007, s. 171). Ei-virusperäiset kuljettajat ovat DNA-pohjaisia komplekseja ja partikkeleita, esimerkiksi DNA-peptidikomplekseja. Nämä ovat tämän työn kohde.

Tämä työ on osa laajempaa tutkimusprojektia, jossa tutkitaan erilaisten kationisten polymeerien ja peptidien käyttöä geeninsiirrossa. Helsingin yliopistolla biofarmasian ja farmakokinetiikan osastolla tutkitaan kantaja-aineiden transfektiotehokkuuksia, miten tehokkaasti kantaja-aineiden kuljettama geneettinen materiaali siirtyy kohdesoluihin. Samaan tutkimusprojektiin liittyen Tampereen teknillisellä yliopistolla tutkitaan DNA:n ja peptidien tai polymeerien sitoutumista komplekseiksi fluoresenssispektroskopian avulla.

Fluoresenssispektroskopian avulla on pystytty mallintamaan DNA-kompleksien muodostumisen mekanismeja uusilla tavoilla, ja menetelmä on vaihtoehto kalliille ja hitaalle soluissa tehtävälle tutkimukselle. Tämä työ keskittyy peptidin $(KK)_2KGGC$ ja DNA:n välisen kompleksin muodostumisen tutkimiseen fluoresenssispektroskopian avulla. Työssä verrataan kompleksin muodostumismekanismeja erilaisissa olosuhteissa, kolmessa eri puskuriliuoksessa ja kahdella eri pH-arvolla. Lisäksi DNA-peptidipartikkelien koko mitattiin Helsingin yliopiston lääketutkimuksen keskuksessa. Koko tutkimusprojektin tuloksien avulla ymmärretään paremmin geeninsiirron eri vaiheita. Viruspohjaisella geeninsiirrolla on parannettu jo sairauksia, mutta geenihoidon tulevaisuus on polymeeri-pohjaisissa DNA-komplekseissa.

2 TEOREETTINEN TAUSTA

Geenihoidon tarkoituksena on hoitaa sairauksia korvaamalla viallinen geeni vastaavalla normaalilla geenillä. Useimmiten geenin kuljettamiseen kohdesoluihin on käytetty viruksia, mutta niiden käyttöön liittyy useita ongelmia, kuten kuljettajavirusten aiheuttamat tulehdukset, virusten myrkyllisyys ja kuljetettavan DNA:n rajallinen koko. (Wagner 1999, s. 279; Lee et al. 2007).

Tässä luvussa käsitellään työn kannalta olennaisia teoreettisia ja muita jo tunnettuja taustoja. Ensin tarkastellaan erilaisten DNA-kompleksien, lähinnä DNA-polymeerikompleksien, käyttöä geeninkuljettajina virusten sijaan, minkä jälkeen keskitytään fluoresenssimittausten taustalla olevaan teoriaan. Lisäksi käydään läpi DNA-peptidi-nanopartikkelin muodostumista ja sen mallinnuksessa käytettyjä teorioita.

2.1 DNA:n kuljettaja

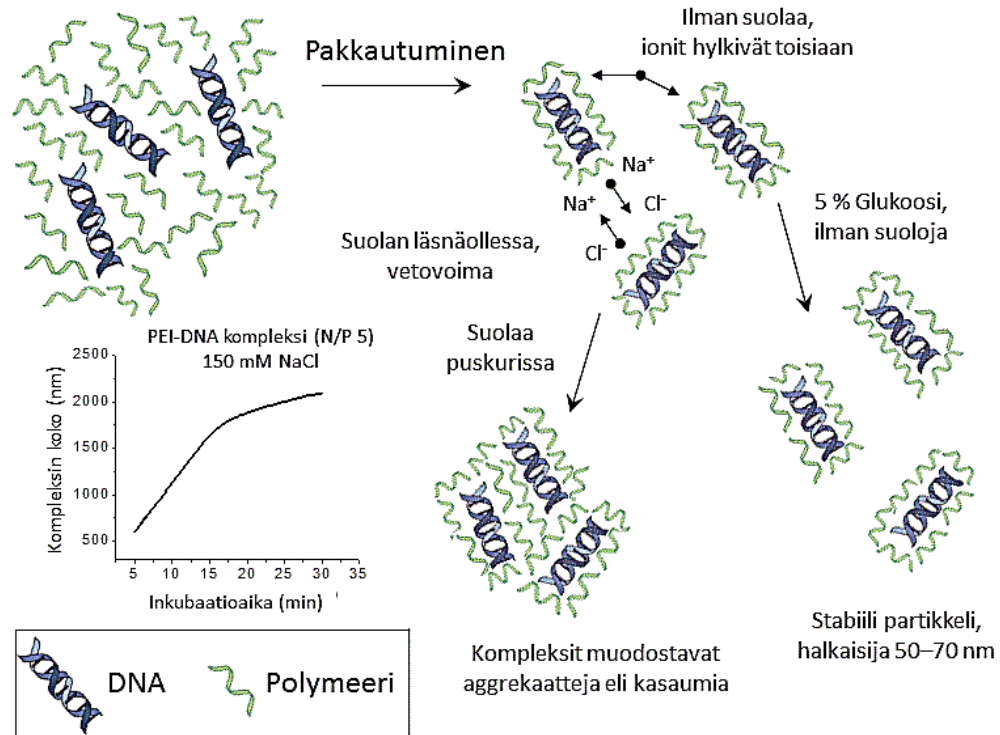
Paljas rengasmaisen plasmidi-DNA voi siirtyä solusta toiseen ja kykenee replikoitumaan eli kopioimaan itseään solussa. Paljasta plasmidi-DNA:ta ja ei-virusperäisiä, kemiallisia, kuljettajia on käytetty geeninkuljettajina noin neljänneksessä kliinisistä kokeista. (Lee et al. 2007, s. 157). Kemialliset kuljettajat ovat halvempia, helpompia valmistaa ja turvallisempia kuin virusperäiset kuljettajat. Kemiallisten kuljettajien haasteita ovat kuitenkin myrkyllisyys ja vähäinen siirtogeenien ilmentyminen, eli solussa muodostuu vain vähän geenin tuottamaa proteiinia. Kemialliset kuljettajat muodostavat myös helposti aggregaatteja eli yhteenliittymiä, jolloin soluun kulkeutuminen vaikeutuu suurentuneen koon takia. Kemiallisten kuljettajien geeninsiirtomekanismit eivät ole vielä täysin selvät. Toisaalta kemiallisten kuljettajien muodostamisessa voidaan hyödyntää useita kemiallisia reaktioita ja vuorovaikutuksia, kun taas kuljettajavirukset on valmistettava soluissa biologisessa ympäristössä. Kemialliset kuljettajat ovat myös muunneltavia kuljetettavan DNA:n koon suhteen ja synteettisiä materiaaleja on helpompi tutkia kuin viruksen rekombinantti- eli yhdistelmä-DNA:ta. (Wagner 1999, s. 280).

Paljas DNA on hieman ongelmallinen kuljettaja, sillä elimistön entsyymit tuhoavat sen nopeasti ja siten geenin ilmentyminen on vain tilapäistä. Ei-virusperäisistä kuljettajina on käytetty erilaisia DNA-komplekseja: DNA-liposomikomplekseja, DNA-peptidikomplekseja ja DNA-polymeerikomplekseja eli polypeksejä. Kompleksilla tarkoitetaan useamman molekyylin yhteenliittymistä ei-kovalenttisilla sidoksilla. Erityyppiset DNA-kompleksit muodostuvat erilailla. Liposomikompleksit muodostuvat lipideistä, eli rasvoista ja rasvamaaisista yhdisteistä. Lipidien toinen pää on vesiliukoinen (hydrofiilinen) ja toinen hydrofobinen. Lipidit muodostavat DNA:n ympärille li-

posomin. Polymeeri on molekyyli, jossa on useita kymmeniä tai satoja pienempiä molekyyliä liittyneenä toisiinsa kemiallisin sidoksia. Peptidimolekyyli koostuu aminohapoista, jotka ovat liittyneet toisiinsa kovalenttisesti peptidisidoksilla. Polymeerit ja peptidit, joissa on kationisia amiiniryhmiä muodostavat komplekseja DNA:n anionisten fosfaattiryhmien avulla. (Wagner et al. 2005, s. 137; Lee et al. 2007, s.157–158). Polymeeripohjaisten kuljettajien on huomattu olevan paljasta DNA:ta tehokkaampia. (Lee et al. 2007). Kuljettajien transfektiotehokkuus, eli tehokkuus siirtää geneettistä materiaalia soluun, riippuu polykationin kemiallisesta rakenteesta, varaustiheydestä ja molekyyli-massasta. (Hashimoto et al. 2005, s. 35). Geeninsiirtoon käytetyt polymeerit suojelevat DNA:ta vaurioilta ja hajoamiselta (Lee et al. 2007, s.160). Polymeeri tiivistää DNA:n, jotta se voi kulkeutua verenkierron kautta kohdekudokseen, ja helpottaa DNA:n kulkeutumista kohdesoluun. Se suojelee DNA:ta esimerkiksi solujen entsyymeiltä, jotka saattavat pilkkoa vierasta DNA:ta. Ideaalitilanteessa tätä voitaisiin hyödyntää mahdollisesti niin, että tiettyä kohdesolua varten olisivat tietyt kuljettajapolymeerit. Polymeeri suojelee DNA:ta myös solun sisällä, auttaa DNA:ta kulkeutumaan tumaan ja purkaa DNA:n kompleksista hallitusti tumassa. Lisäksi polymeerin on oltava myrkytön, se ei saa vaikuttaa elimistön puolustusjärjestelmään ja sen on oltava biohajoava. (Wagner et al. 2005, s. 137).

Tärkein polymeerin ominaisuus on kuitenkin kompleksin muodostaminen DNA:n kanssa. DNA ja polymeeri muodostavat kompleksin sähköisten varausten avulla. Kompleksin muodostumiseen vaikuttavat useat polymeerin ominaisuudet: varausten lukumäärä polymeerimolekyyliässä, polymeerin kationisten ryhmien tyyppi, varauksien tiheys polymeerissä, polymeerin haarautuneisuuden aste, polymeerin moolimassa eli sen pituus sekä polymeerin hydrofobisuus. Kompleksin muodostumiseen vaikuttaa myös liuoksen konsentraatio, polymeerin positiivisten ja DNA:n negatiivisten varausten suhde sekä kompleksin muodostumisprosessi. (Wagner et al. 2005, s. 138–139).

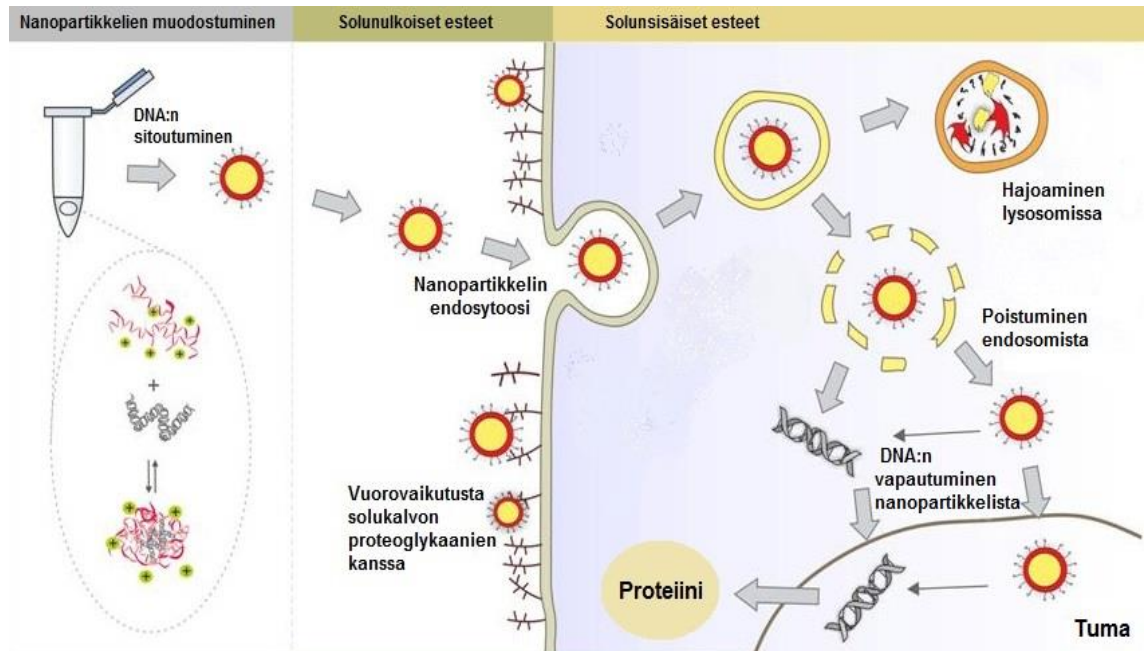
Myös liuoksen pH-arvo vaikuttaa kompleksin muodostumiseen, sillä alemmassa pH:ssa suurempi osa polymeerin amiiniryhmistä on protonoituneena. Kun pH-arvo on sama kuin amiiniryhmän pK_a , puolet amiiniryhmistä on protonoituneena. Mitä matalampi pH-arvo, sitä korkeampi protonoitumisaste. Liuoksen ionivahvuudella on myös huomattu olevan vaikutusta kompleksin muodostumiseen. Jos liuoksessa on suoloja, eli liuoksen ionivahvuus on suurempi, muodostuneet kompleksit muodostavat helpommin kasaumia. Ionivahvuuden kasvaessa vesimolekyylit hydratoivat elektrolyytti-ioneja, eikä polypleksejä, jolloin polypleksit aggregoituvat. Aggregaattien takia DNA:n kuljettaminen soluun vaikeutuu. Kun liuoksessa ei ole suolaa, polypleksit hylkivät toisiaan ja partikkelikoko pysyy pienenä. Kuvassa 2.1. on esitetty miten suola vaikuttaa kompleksien kasautumisessa. (Wagner et al. 2005, s. 138–139; Ketola 2014, s. 8).



Kuva 2.1. Polyetyleni-imiinin ja DNA:n muodostamien kompleksien koko erilaisissa liuksissa (Muokattu lähteestä Zuber et al. 2009, s.113).

Ketolan et al. (2013) tutkimuksessa on määritetty poly(L-lysiinin) (PLL) ja DNA:n sekä polyetyleni-imiinin (PEI) ja DNA:n muodostamien kompleksien kokoja. Ketolan tutkimuksessa DNA:n ja polymeerin suhdetta laskettiin N/P-suhteella, polymeerin kationisten amiinien (N-ryhmien) konsentraation suhteella DNA:n anionisten fosfaattiryhmien (P-ryhmien) konsentraatioon. Kun N/P-suhde oli alle kaksi, kompleksin koko oli 300–400 nm pH-arvolla 5,2 ja 400–500 nm pH-arvolla 7,4. N/P-suhteen ollessa kaksi partikkelikoko kasvoi yli 2000 nm:n. Kun polymeeriä lisättiin ja N/P-suhde kasvoi, partikkelikoko pieneni jälleen alle 300 nm:n. Samassa Ketolan tutkimuksessa todettiin, että N/P-suhteella 2 lähes kaikki DNA:n fosfaattiryhmät olivat sitoutuneet polymeerin amiiniryhmään. Useissa tutkimuksissa (Tang et al. 1997; Choosakoonkriang et al. 2002; Ikonen et al. 2008) on todettu kompleksin pinnan varauksen, eli zeta-potentiaalin muuttuvan negatiivisesta positiiviseksi kun N/P-suhde kasvaa yli arvon 2. Kun DNA-polymeeripartikkelilla ei ole varausta, kaikissa DNA:n negatiivisissa fosforiryhmissä on sitoutunut positiivinen amiiniryhmä, mutta amiiniryhmiä ei ole vielä ylimäärin. Kun N/P-suhde on yli kaksi, ylimääräpolymeeri ei siis sitoudu DNA:n fosfaattiryhmiin, vaan muodostaa kuoren DNA-polymeeri partikkelin ympärille. Suuret partikkelikoot N/P-suhteen arvolla 2 johtuvat aggregaattien muodostumisesta, kun partikkelien varaus on lähes neutraali. Transfektiokoeksissa (Dai et al. 2011; Hanzlíková et al. 2011) PEI on ollut tehokkaimmillaan N/P-suhteilla 3–15, joten ylimääräpolymeeri on tärkeää geeninsiirron tehokkuudessa, sillä muodostaessaan kuoren DNA-polymeeri partikkelin ympärille, se estää aggregoitumista ja partikkelien koko pysyy riittävän pienenä.

DNA:n kuljettajina on enimmäkseen käytetty polymeerejä ja lipidejä, peptidejä sen sijaan on käytetty huomattavasti vähemmän. Kationisten peptidien käyttö geeninsiirrossa perustuu samoihin edellä mainittuihin syihin kuin polymeerien käyttö. Kuvassa 2.2 on esitetty DNA:n kulkeutuminen soluun ja sen tumaan polymeerin avulla.



Kuva 2.2. Geeninsiirron eri vaiheet: nanopartikkelin, eli DNA-kompleksin muodostuminen sekä kantaja-aineen pääsy soluun ja sen tumaan.

DNA:n on päästävä solun tumaan, jotta geenihoito on mahdollista. DNA:n kulkeutumisessa on monta vaihetta: DNA:n pakkaaminen kationisen yhdisteen, esimerkiksi polymeerin tai peptidin avulla, DNA-kompleksin hakeutuminen solun pintaan ja endosytoosi, eli aktiivinen aineenotto solun sisään, jolloin muodostuu rakkula eli endosomi. DNA-kompleksin on poistuttava rakkulasta ja vältettävä lysosomiin joutuminen. Lysosomit ovat soluelimiä, jotka hajottavat entsyymien avulla soluihin kulkeutunutta vierasta ainetta. Jos DNA päätyy tumaan, solu tuottaa haluttua geeniä vastaavan lähetti-RNA:n, joka sisältää geneettisen informaation sellaisessa muodossa, joka voidaan kääntää proteiinien aminohappojärjestykseksi. (Martin et al. 2007).

Geeninsiirrossa käytetyt polymeerit sisältävät satoja tai jopa tuhansia kationisia amiiniryhmiä. Peptideissä on enimmillään joitakin kymmeniä amiiniryhmiä. Peptidien vahvuus geeninsiirrossa onkin niiden lyhyt ketju, sillä DNA-peptidikompleksiin voidaan sitoa montaa erilaista peptidiä. Osa peptideistä voi keskittyä DNA:n pakkaamiseen, osa osallistua kohdesolun tunnistamiseen ja osa DNA:n vapauttamiseen kohdesolussa. (Mahato et al. 1999; Martin et al. 2007).

2.2 Fluoresenssi

Kun molekyyliä säteilytetään fotoneilla, tapahtuu fotonin absorptio (yhtälö 2.1), jos fotonin energia on vähintään yhtä suuri kuin molekyylin elektronisen perustilan ja viritystilän välinen energiaero. Tällöin molekyyli virittyy, eli yksi molekyylin elektroneista siirtyy ylemmälle energiatilalle. Virittyneen molekyylin palautuessa takaisin perustilalle saattaa fotonit emittoitua eli tapahtua fluoresenssi (yhtälö 2.2). Viritys voi purkautua myös sisäsiirtymänä (internal conversion, ic, yhtälö 2.3), jolloin energiaero purkautuu lämpöenergiana, tai systeemien välisenä siirtymänä triplettitilalle (intersystem crossing, isc, yhtälö 2.4). Triplettitilasta purkautuminen voi tapahtua joko systeemien välisenä siirtymänä (isc, yhtälö 2.6) tai fosforesenssina (p, yhtälö 2.5), jolloin emittoituu fotonit. (Valeur 2002, s. 46).

Eri siirtymiä kuvaavat yhtälöt ja niiden nopeusyhtälöt voidaan esittää perustilan S_0 , viritystilän S_1 ja triplettitilan T_1 avulla seuraavasti:

$$\text{Absorptio/virittyminen} \quad S_0 + h\nu \rightarrow S_1, \quad r_a = k_a[S_0], \quad (2.1)$$

$$\text{Fluoresenssi} \quad S_1 \rightarrow S_0 + h\nu, \quad r_f = k_f[S_1], \quad (2.2)$$

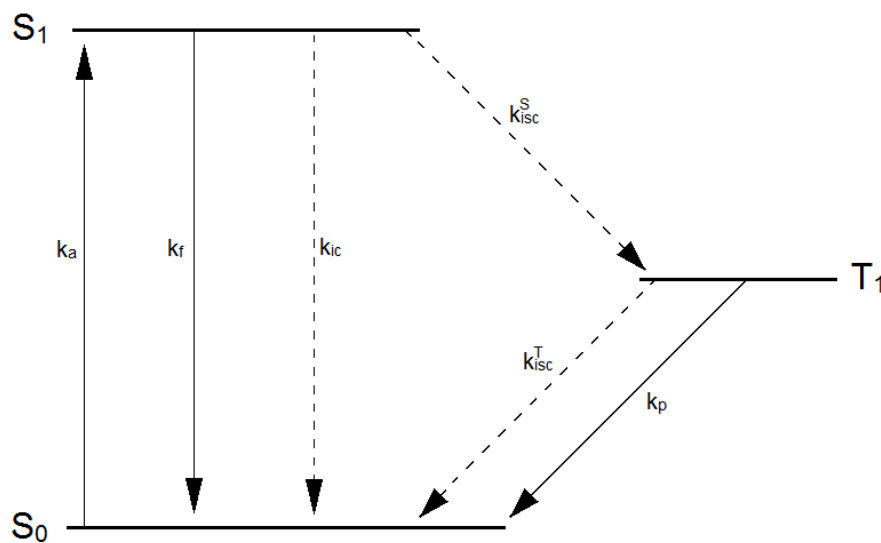
$$\text{Sisäsiirtymä} \quad S_1 \rightarrow S_0, \quad r_{ic} = k_{ic}[S_1], \quad (2.3)$$

$$\text{Systeemien välinen siirtymä} \quad S_1 \rightarrow T_1, \quad r_{isc}^S = k_{isc}^S[S_1], \quad (2.4)$$

$$\text{Fosforesenssi} \quad T_1 \rightarrow S_0 + h\nu, \quad r_p = k_p[T_1], \quad (2.5)$$

$$\text{Systeemien välinen siirtymä} \quad T_1 \rightarrow S_0, \quad r_{isc}^T = k_{isc}^T[T_1], \quad (2.6)$$

Yhtälöissä r_i kuvaa kunkin siirtymän nopeutta ja k_i nopeusvakioita. Merkintä $h\nu$ kuvaa fotonin energiaa, h on Planckin vakio ja ν fotonin taajuus. Molekyylin virittyminen ja viritystilän eri purkautumistavat voidaan esittää Jablonskin diagrammin avulla (Kuva 2.3.).



Kuva 2.3. Yksinkertaistettu Jablonskin diagrammi. k_i on kunkin siirtymän nopeusvakio. (Muokattu lähteestä Valeur 2002, s. 43).

Nopeusvakioiden k_i avulla voidaan esittää viritystilan purkautumisnopeus:

$$-\frac{d[S_1]}{dt} = (k_f + k_{ic} + k_{isc}^S)[S_1], \quad (2.7)$$

missä $[S_1]$ on virittyneiden molekyylien määrä. Kun merkitään virittyneiden molekyylien alkukonsentraatiota $[S_1]_0$, saadaan differentiaaliyhtälön ratkaisuksi

$$[S_1] = [S_1]_0 e^{-\frac{t}{\tau_S}}, \quad (2.8)$$

missä τ_S on viritystilan S_1 elinaika,

$$\tau_S = \frac{1}{k_f + k_{ic} + k_{isc}^S}. \quad (2.9)$$

Fluoresenssin kvanttisuhde kuvaa kuinka suuri osuus virittyneistä molekyyleistä palaa perustilalle emittoimalla fotonin, eli fluoresoimalla. Toisin sanoen, fluoresenssin kvanttisuhde on emittoituneiden fotonien lukumäärän suhde absorboituneiden fotonien lukumäärään. (Valeur 2002, s. 46, 50). Kvanttisuhde voidaan esittää myös nopeusvakioiden avulla:

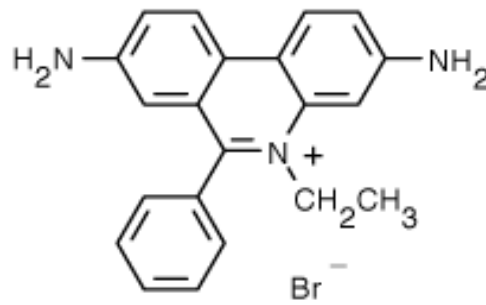
$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_{ic} + k_{isc}^S} = k_f \tau_S. \quad (2.10)$$

Fluoresenssin intensiteetti absorboitunutta fonia kohti riippuu emittoituneen fotonin aallonpituudesta ja se noudattaa yhtälöä

$$\Phi = \int F_\lambda(\lambda_F) d\lambda_F, \quad (2.11)$$

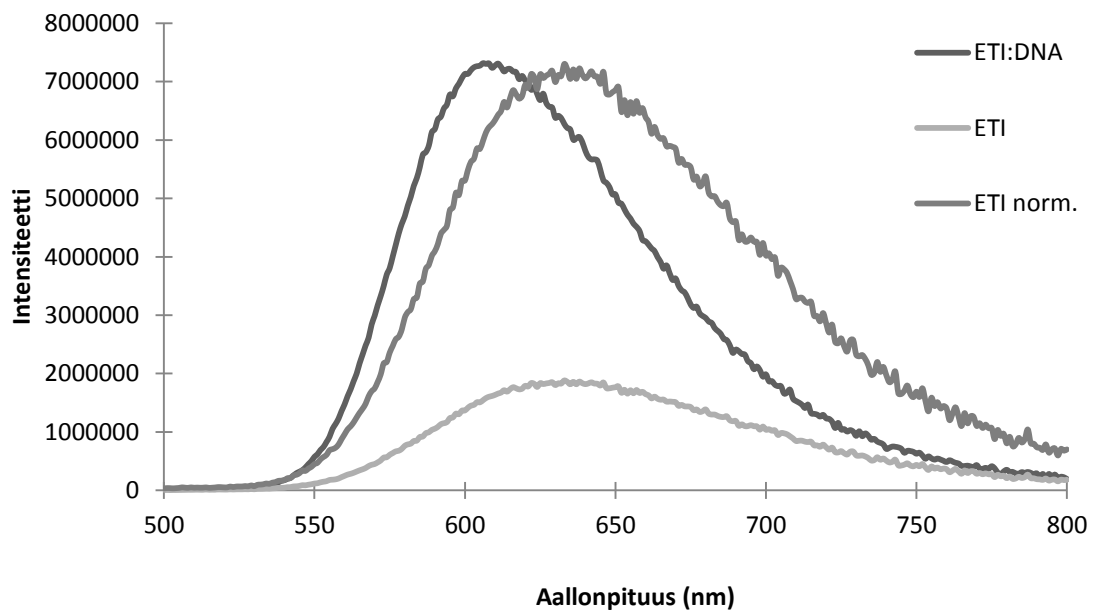
missä Φ on fluoresenssin kvanttisuhde ja $F_\lambda(\lambda_F)$ kuvaa fluoresenssi- eli emissiospektriä. (Valeur 2002, s. 50). Käytännössä mitataan fluoresenssin intensiteettiä $I(\lambda_F)$ aallonpituuden funktiona. Intensiteetti on verrannollinen emissiospektriin $F_\lambda(\lambda_F)$ ja absorboituneiden fotonien lukumäärään viritysaallonpituudella.

DNA fluoresoi heikosti, sillä on siis pieni kvanttisuhde, ja tästä syystä mittauksissa käytetään fluoresoivia merkkiaineita, tässä työssä etidiumbromidia (ETI, kuva 2.4.). Merkkiaineen fluoresoivat ominaisuudet muuttuvat, kun DNA muodostaa peptidin kanssa kompleksin. Tämä ominaisuuksien muuttuminen on tutkimuksen kannalta tärkeää, jotta voidaan mitata kuinka suuri osuus DNA:sta on sitoutunut peptidin kanssa, ja kuinka suuri osuus sitoutumatta. Lisäksi on tärkeää, että merkkiaineella on suuri kvanttisuhde joko DNA-peptidikompleksin läsnä ollessa tai ilman.



Kuva 2.4. Etidiumbromidin eli ETI:n rakennekaava.

ETI interkaloituu, eli tunkeutuu, DNA:n emästen väliseen tilaan. Kun DNA muodostaa nanopartikkelin peptidin kanssa, ETI vapautuu. Vapaan ETI:n ja interkaloituneen ETI:n valokemialliset ominaisuudet poikkeavat toisistaan. Vapaan ETI:n fluoresenssimaksimi on aallonpituudella 640 nm ja interkaloituneen 610 nm (kuva 2.5.). (Ketola 2014, s. 15).



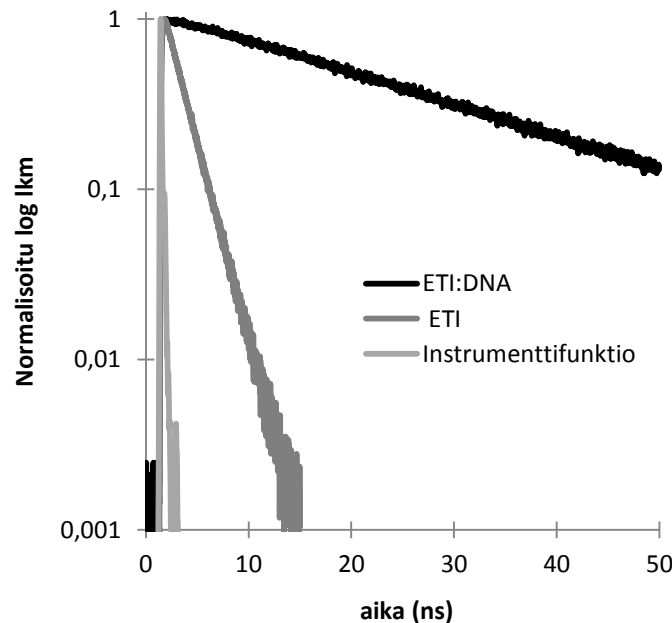
Kuva 2.5. Vapaan ETI:n ja interkaloituneen ETI:n (ETI:DNA) fluoresenssispektrit sekä ETI:n edellisen suhteen normitettu spektri (ETI norm.). Viritysaallonpituus 480 nm.

Vapaa ETI fluoresoi heikommin kuin interkaloitunut ETI, eli niiden fluoresenssin kvanttisuhteet poikkeavat toisistaan. Vapaan ETI:n ja DNA:han interkaloituneen ETI:n (merkitään tässä ED) fluoresenssin kvanttisuhteille saadaan suhde:

$$\Phi_{ETI}^{rel} = \frac{\Phi_{ETI}}{\Phi_{ED}} = \frac{I_{ETI}/A_{ETI}}{I_{ED}/A_{ED}} = \frac{I_{ETI}}{I_{ED}} \cdot \frac{A_{ED}}{A_{ETI}}, \quad (2.12)$$

missä I on fluoresenssispektrin pinta-ala ja A on absorbanssi viritysaallonpituudella 483 nm.

Fluoresenssin elinaika saadaan määritettyä, kun tarkastellaan fluoresenssin intensiteettiä ajan funktiona. Fluoresenssin elinaika on se ajanhetki, jolla intensiteetti on vaimentunut $1/e$ -osaan maksimista. (Valeur 2002, s. 45). Kuvassa 2.6. on esitetty interkaloituneen ja vapaan ETI:n fluoresenssin vaimenemiskuvaajat.



Kuva 2.6. Vapaan ETI:n ja interkaloituneen ETI:n (ETI:DNA) fluoresenssin vaimenemiskuvaajat sekä instrumenttifunktio, eli laitteen vaste.

Kuvassa 2.6. näkyy, että interkaloituneen ETI:n elinaika on huomattavasti pidempi kuin vapaan ETI:n. Ketolan (2014) mukaan pH-arvolla 7,4 interkaloituneen ETI:n elinaika on 23,67 ns ja vapaan ETI:n 1,79 ns.

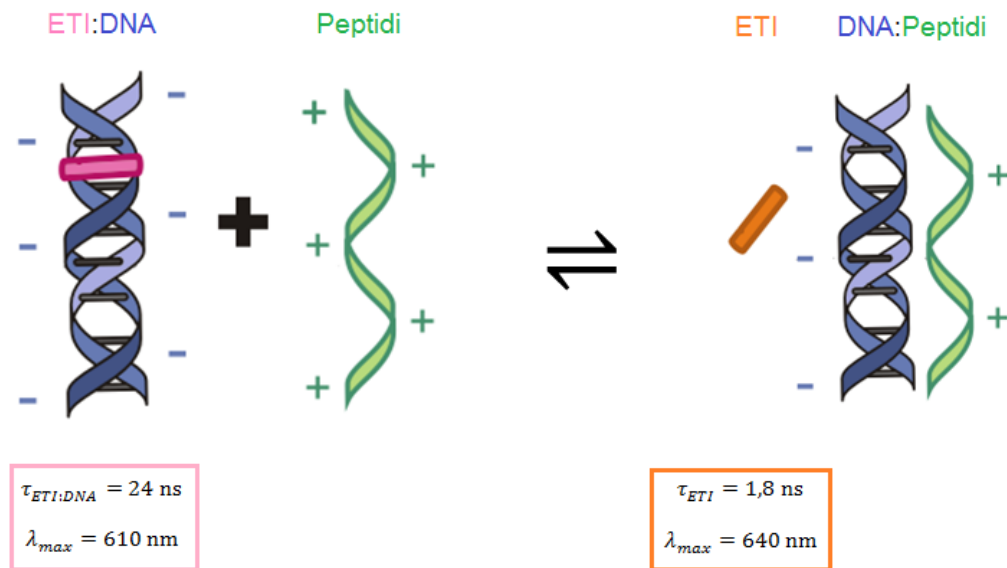
2.3 Kompleksien muodostuminen

DNA:n fosfaattiryhmän ja peptidin (P) amiiniryhmän reaktio voidaan yksinkertaistaa muotoon



Kompleksien (DNA:P) muodostumista voidaan seurata valokemiallisilla menetelmillä. Fluoresoiva merkkiaine ETI ei vaikuta nanopartikkelin muodostumiseen ja ETI:n määrä systeemeissä on valittu siten, että alussa kaikki ETI on interkaloitunut DNA:han. DNA:n konformaatio muuttuu sen muodostaessa nanopartikkelin peptidin kanssa. Tällöin ETI

ei enää mahdu interkaloitumaan DNA:han. Lisäksi nanopartikkelin muodostuttua ETI:n ympäristö muuttuu positiivisemmaksi, mikä aiheuttaa hylkimistä. ETI siis vapautuu liuokseen (Kuva 2.7.).



Kuva 2.7. Kompleksin DNA:P muodostuminen ETI:n läsnä ollessa (Muokattu lähteestä Ketola 2014 s.16).

Interkaloituneen ETI:n vapautuminen voidaan esittää myös yhtälönä:



Vapaan ETI:n ja interkaloituneen ETI:n valokemialliset ominaisuudet poikkeavat toisistaan, sillä interkaloituneella ETI-molekyylillä on vähemmän liikkumatilaa. Vapaan ETI:n sidoksilla on enemmän vapausasteita, siksi ETI:n fluoresenssin intensiteetti ja elinaika kasvavat kun se interkaloituu DNA:han (Byrne et al. 1998, s. 174). Vapaan ETI:n määrä on suoraan verrannollinen kompleksien määrään, eli

$$[\text{DNA:P}] \propto [\text{ETI}]. \quad (2.15)$$

Vastaavasti interkaloituneen ETI:n ja vapaan DNA:n määrät ovat myös keskenään verrannollisia

$$[\text{DNA}] \propto [\text{DNA:ETI}]. \quad (2.16)$$

Yhtälöiden (2.15) ja (2.16) perusteella vapaan ETI:n määrän suhde interkaloituneen ETI:n määrään on sama kuin sitoutuneen DNA:n määrän suhde vapaan DNA:n määrään, eli

$$\frac{[DNA:P]}{[DNA]} = \frac{[ETI]}{[DNA:ETI]}. \quad (2.17)$$

Vapaan ja interkaloituneen ETI:n fluoresenssin elinajat poikkeavat toisistaan. Peptidin läsnä ollessa näytteissä on ETI:ä sekä vapaana että interkaloituneena, joten fluoresenssin vaimenemiskäyrä voidaan esittää kahden eksponenttifunktion summana

$$I(t, \lambda) = a_1(\lambda)e^{-t/\tau_1} + a_2(\lambda)e^{-t/\tau_2}, \quad (2.18)$$

missä τ_i on elinaika ja $a_i(\lambda)$ on amplitudi. Vaimenemiskäyrät voidaan määrittää eri aallonpituuksilla. Komponenttien elinajat eivät riipu mittausaallonpituudesta, eli yhtälön (2.18) elinajat τ_i ovat samat kaikilla aallonpituuksilla. Kun aallonpituudesta riippuvat kertoimet $a_i(\lambda)$ esitetään aallonpituuden funktiona, saadaan komponenttisperä, eli DAS-kuvaaja (decay-associated spectrum). Spektrin pinta-ala saadaan integroimalla kertoimet mittausalueen yli

$$A_i = \int a_i(\lambda) d\lambda. \quad (2.19)$$

Koska vapaan ETI:n kvanttisuhde on pienempi kuin DNA:han interkaloituneen ETI:n, sen pinta-ala korjataan tekijällä Φ_{ETI}^{rel} (yhtälö (2.12)). Spektrin pinta-alan avulla saadaan laskettua vapaan ETI:n suhteellinen osuus B

$$B = \frac{A_1}{A_1 + A_2}, \quad (2.20)$$

missä A_1 on lyhytikäisen komponentin, eli vapaan ETI:n spektrin pinta-ala, ja A_2 on interkaloituneen ETI:n spektrin pinta-ala. Muodostuneiden kompleksien määrä on suoraan verrannollinen vapaan ETI:n määrään, joten B kuvaa myös sitoutuneen DNA:n osuutta. (Ketola et al. 2011, s.1899).

2.4 Sitoutumisvakiot

Sitoutumisvakiolla tarkoitetaan kompleksin muodostumisen tasapainovakiota. Tässä luvussa esitetään kaksi erilaista tapaa mallintaa DNA-peptidikompleksin muodostumista. Ensimmäisenä on esitetty riippumaton sitoutumisteoria, jossa jo sitoutuneet amiiniryhmät eivät vaikuta seuraavien amiiniryhmien sitoutumiseen. Tässä yhteydessä sitoutumista tarkastellaan yhden DNA:n fosfaattiryhmän kannalta. Kompleksin muodostumisreaktio on esitetty yhtälössä (2.13). Muodostumisreaktion tasapainovakio on

$$K_r = \frac{[DNA:P]}{[DNA][P]}. \quad (2.21)$$

Sitoutuneiden DNA:n fosfaattiryhmien osuus on sitoutuneen DNA:n määrän suhde DNA:n kokonaismäärään. Sitoutuneen DNA:n osuus B voidaan ilmaista myös tasapainovakion avulla:

$$B = \frac{[DNA:P]}{[DNA] + [DNA:P]} = \frac{K_r [DNA][P]}{[DNA] + K_r [DNA][P]} = \frac{K_r [P]}{1 + K_r [P]}, \quad (2.22)$$

josta saadaan yhtälön (2.20) avulla

$$\frac{A_1}{A_1 + A_2} = \frac{K_r [P]}{1 + K_r [P]}. \quad (2.23)$$

Sitoutuneen DNA:n osuudelle B ja peptidin amiinikonsentraatiolle $[P]$ halutaan lineaarinen riippuvuus. Tämä onnistuu kääntämällä yhtälö (2.23) ympäri

$$\frac{A_1 + A_2}{A_1} = \frac{1 + K_r [P]}{K_r [P]}, \quad (2.24)$$

josta saadaan

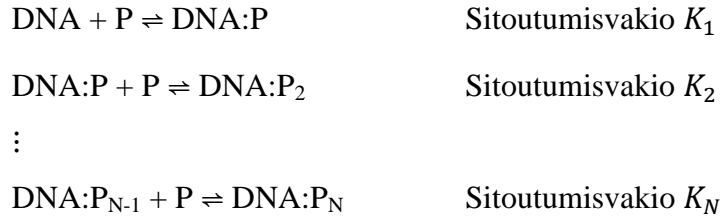
$$1 + \frac{A_2}{A_1} = \frac{1}{K_r [P]} + 1, \quad (2.25)$$

joka sievenee vielä muotoon

$$\frac{A_2}{A_1} = \frac{1}{K_r [P]}, \quad (2.26)$$

missä K_r on riippumaton sitoutumisvakio, $[P]$ on peptidin amiinikonsentraatio. Kun piirretään $\frac{A_2}{A_1}$ amiinikonsentraation $[P]$ käänteisluvun funktiona, tasapainovakio K_r saadaan määritettyä suoran kulmakertoimesta. Tasapainovakio K_r kuvaa sitoutumisvakiota amiiniryhmää kohti. (Engel et al. 2008, s. 286).

Todellisuudessa amiiniiryhmien sitoutuminen ei voi olla riippumatonta, vaan amiiniryhmät vaikuttavat toistensa sitoutumiseen, jo senkin takia, että amiiniryhmiä on useita samassa peptidimolekyylissä. Kooperatiivisessa sitoutumisessa ensimmäinen sitoutunut amiiniryhmä vaikuttaa seuraavien amiiniryhmien sitoutumiseen (Tinoco, s. 202). DNA:n, jolla on N sitoutumispaikkaa, ja amiiniryhmän (P) sitoutumista voidaan kuvata yhtälöillä:



Kokonaisreaktion sitoutumisvakio on

$$K_{tot} = K_1 \times K_2 \times \dots \times K_N = \frac{[\text{DNA:P}_N]}{[\text{DNA}][\text{P}]^N}. \quad (2.27)$$

Kun oletetaan eri tasapainovakiot yhtä suuriksi, yhtälön (2.17) avulla saadaan

$$(K_{ko})^N = K_1 \times K_2 \times \dots \times K_N = \frac{[\text{DNA:P}_N]}{[\text{DNA}][\text{P}]^N}, \quad (2.28)$$

missä sitoutuneen DNA:n määrän suhde sitoutumattoman DNA:n määrään voidaan esittää myös sitoutuneen DNA:n osuuden B avulla, yhtälön (2.20) perusteella:

$$\frac{[\text{DNA:P}_N]}{[\text{DNA}]} = \frac{B}{1-B} = \frac{\frac{A_1}{A_1+A_2}}{1-\frac{A_1}{A_1+A_2}} = \frac{\frac{A_1}{A_1+A_2}}{\frac{A_1+A_2-A_1}{A_1+A_2}} = \frac{\frac{A_1}{A_1+A_2}}{\frac{A_2}{A_1+A_2}} = \frac{A_1}{A_2}. \quad (2.29)$$

Edellisen yhtälön avulla saadaan yhtälö (2.28) muotoon

$$(K_{ko})^N = \frac{A_1}{A_2[\text{P}]^N}, \quad (2.30)$$

josta saadaan edelleen

$$[\text{P}]^N (K_{ko})^N = \frac{A_1}{A_2}. \quad (2.31)$$

Kun yhtälö (2.31) esitetään logaritmi-lausekkeena, saadaan nk. *Hill'in* yhtälö

$$\ln \frac{A_1}{A_2} = N \ln[\text{P}] + N \ln K_{ko}. \quad (2.32)$$

Kun piirretään $\ln \frac{A_1}{A_2}$ amiinikonsentraation logaritmin funktiona, suoran leikkauspisteestä saadaan sitoutumisvakio K_{ko} ja kulmakertoimesta täysin kooperatiivisten sitoutumispaikkojen lukumäärä N .

Käytännössä yhtälön (2.32) kuvaajasta ei aina tule suora, vaan useammasta lineaarisesta osasta koostuva murtoviiva. Kaikki DNA:n sitoutumispaikat eivät todellisuudessa täyty muun muassa molekyylien avaruudellisen geometrian takia, joten kuvaajan kulmakerroin ei vastaa sitoutumispaikkojen lukumäärää N . Kooperatiivisuuden aste on usein jotain monimutkaisempaa kuin edellä kuvattu täysin kooperatiivinen sitoutuminen, siksi *Hill'in* yhtälö voidaan korvata empiirisellä yhtälöllä

$$\ln \frac{A_1}{A_2} = \alpha \ln[P] + \alpha \ln K_{ko}, \quad (2.33)$$

missä kokeellinen Hill'in kerroin α kuvaa sitoutumisen kooperatiivisuusastetta. Sitoutuneen DNA:n osuus voidaan ilmaista keskimääräisen sitoutumisvakion avulla, vastaavasti kuin ideaalisessa tapauksessa (yhtälö (2.22)), jolloin saadaan

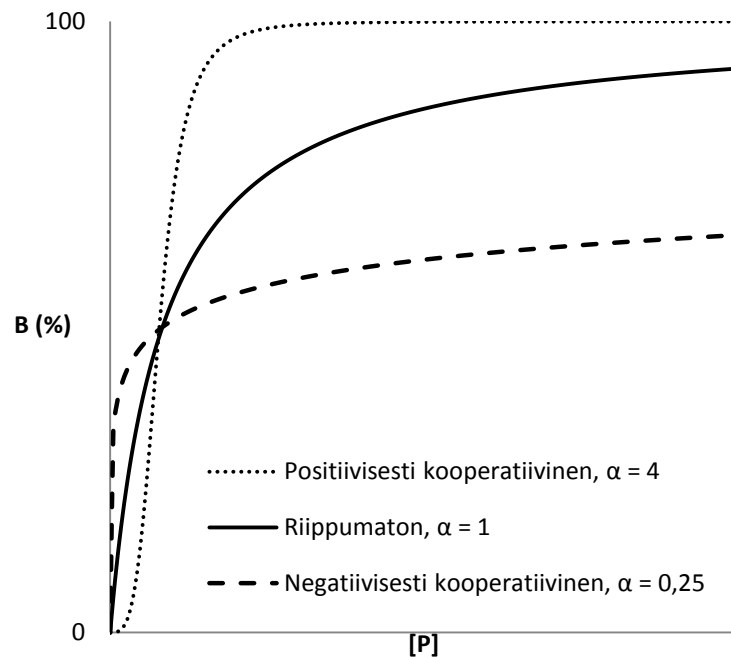
$$B = \frac{[P]^N (K_{ko})^N}{1 + [P]^N (K_{ko})^N}. \quad (2.34)$$

Edellinen yhtälö korvataan käytännössä kokeellisella yhtälöllä

$$B = \frac{[P]^\alpha (K_{ko})^\alpha}{1 + [P]^\alpha (K_{ko})^\alpha}. \quad (2.35)$$

Vertaamalla yhtälöä (2.35) ja ideaalitapausta kuvaavaa yhtälöä (2.22) huomataan, että kooperatiivinen teoria vastaa riippumatonta tilannetta kun α saa arvon yksi. Tällöin kooperatiivisen teorian mukaan aikaisemmin sitoutunut amiiniryhmä ei vaikuta seuraavien sitoutumiseen. Jos α on pienempi kuin yksi, sitoutuminen on negatiivisesti kooperatiivista, eli aikaisemmin sitoutunut amiiniryhmä vaikeuttaa seuraavien sitoutumista. Jos taas α on suurempi kuin yksi, sitoutumista kutsutaan positiivisesti kooperatiiviseksi ja tällöin aikaisemmin sitoutunut amiiniryhmä edesauttaa seuraavien sitoutumista. (Engel et al. 2008, s. 288–289).

Kuvassa 2.8. on vertailtu riippumatonta ja kooperatiivista sitoutumista esittämällä sitoutuneen DNA:n osuus B peptidikonsentraation funktiona kun sitoutumisvakio K_{ko} on 6000 kaikissa tapauksissa ja Hill'in kerroin α on negatiivisesti kooperatiivisessa tapauksessa 0,25, riippumattomassa tasan yksi ja positiivisesti kooperatiivisessa 4.



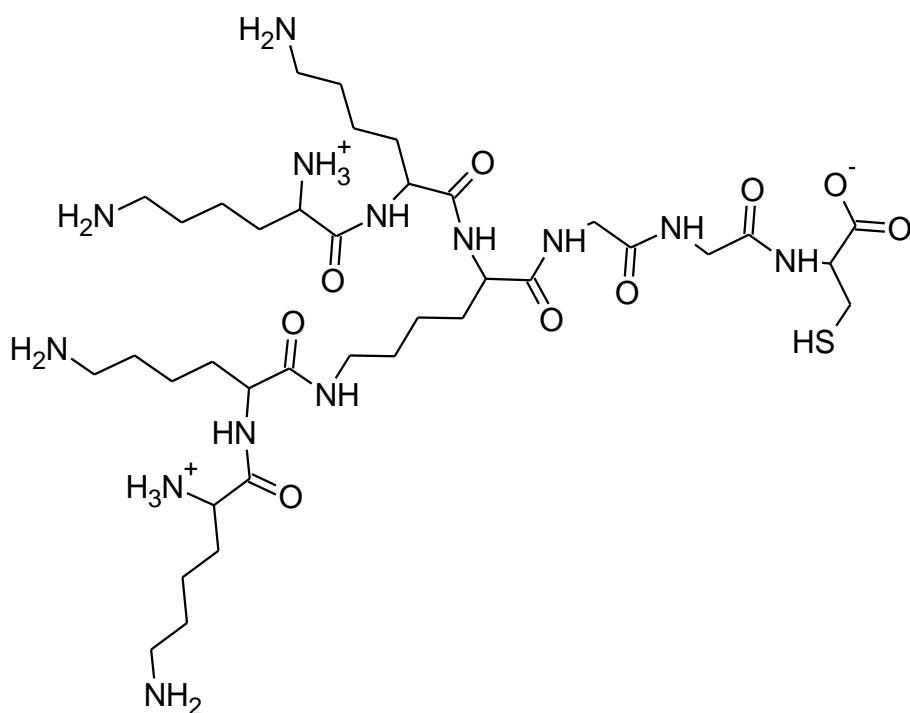
Kuva 2.8. Kooperatiivisten ja riippumattoman sitoutumisten vertailu, jossa sitoutuneen DNA:n osuus on esitetty peptidikonsentraation funktiona. Sitoutumisvakio K_{ko} 6 000 kaikissa tapauksissa

Kooperatiivisuuden asteen vaikutus näkyy hyvin kuvassa 2.8. Positiivisesti kooperatiivisessa sitoutumisessa amiiniryhmän sitoutumista edesauttavat jo sitoutuneet amiiniryhmät. Tällöin pienillä peptidikonsentraatioilla peptidin lisäyksellä ei ole suurta merkitystä sitoutuneen DNA:n määrään, mutta tietyn peptidikonsentraation jälkeen peptidin lisäyksellä on huomattavasti suurempi vaikutus sitoutuneen DNA:n määrään. Positiivisesti kooperatiivinen sitoutuminen näkyy sitoutuneen DNA:n määrän kuvaajassa s-muotona. Kun sitoutuminen on positiivisesti kooperatiivista, saturoitumisaste on lähes 100 %. Mitä pienempi on kooperatiivisuuden aste, sitä pienempi on myös saturoitumisaste. Negatiivisesti kooperatiivisessa sitoutumisessa sitoutumisaste kasvaa jyrkästi pienillä peptidimäärillä. Aiemmin sitoutuneet amiiniryhmät haittaavat seuraavien sitoutumista, siksi negatiivisesti kooperatiivisessa sitoutumisessa sitoutumisaste ei lainkaan saavuta täyttä 100 %:a. Sitoutumisvakion K_{ko} suuruudesta riippuen saturoitumisaste voidaan saavuttaa erilaisilla peptidikonsentraatioilla. Mitä suurempi sitoutumisvakio, sitä vähemmän peptidiä vaaditaan. (Engel et al. 2008, s. 290).

3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Työssä käytetyt yhdisteet

Työssä tutkittiin haaroittunutta peptidiä $(KK)_2KGGC$, missä aminohappo K on lysiini, G on glysiini ja C on kysteiini. Peptidin kemiallinen rakenne on havainnollistettu kuvassa 3.1. Peptidi hankittiin Biomatikilta (USA, Wilmington).



Kuva 3.1. Peptidin $(KK)_2KGGC$ rakennekaava neutraalissa vesiliuoksessa.

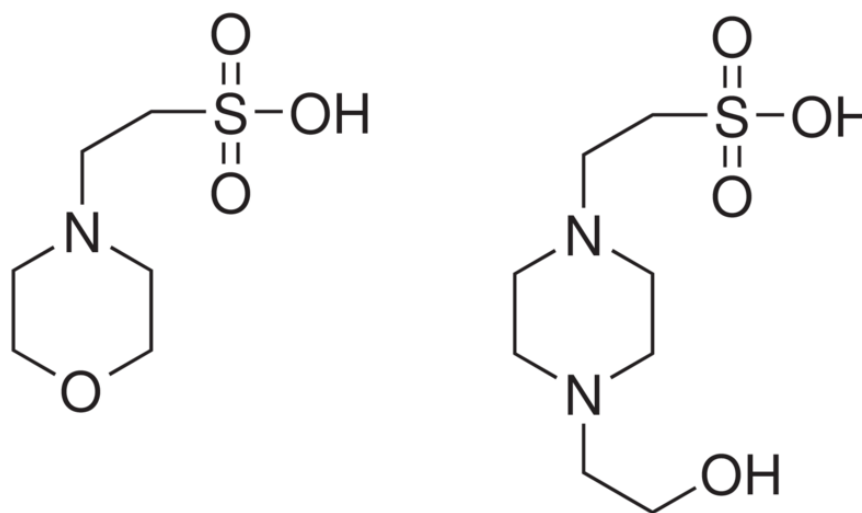
Aminohapot sitoutuvat toisiinsa kovalenttisesti peptidisidoksilla, siten että aminohapon amiiniryhmä liittyy toisen aminohapon karboksyyliin. Peptidin $(KK)_2KGGC$ molekyylimassa on 876,13 g/mol. Molekyylissä on sivuketjuissa neljä primääristä amiinia ja pääteryhminä aminotermiinaalit, joita haaroittuneessa peptidissä on kaksi sekä yksi happotermiinaali. Aminohappojen aminoryhmien happovakiot pK_a ovat kaikilla kolmella aminohapolla vähintään 8,95 ja kysteiinin happotermiinaalin happovakio pK_a on 2,05 (Parril 1997). Peptidisidoksiin osallistuvat aminoryhmät eivät osallistu DNA:han sitoutumiseen. Näin ollen peptidimolekyylissä on kuusi aktiivista positiivisesti varautunutta aminoryhmää pH-arvoilla 5–8. Yhden aktiivisen amiiniryhmän vaikutuksen ajatellaan kumoutuvan happotermiinaalilla, jonka varaus on -1, joten peptidimolekyylin osalta

N/P-suhdetta laskettaessa otetaan huomioon viisi aktiivista aminoryhmää, jotka osallistuvat DNA:han sitoutumiseen (Plank et al. 1999, s. 327). Peptidin molekyylimassa aktiivista amiiniryhmää kohden on siten $876,13:5 \text{ g/mol} = 175,226 \text{ g/mol}$.

Työssä käytettiin plasmidia pCMV- β , joka tuottaa galaktosidaasi-entsyymiä. Plasmidi on tuotettu *Escherichia coli* -bakteerissa, eristetty ja puhdistettu QIAfilter Plasmid Giga Kitillä (QIAGEN Inc, Valencia, CA, USA) Helsingin yliopistossa, Biofarmasian ja farmakokinetiikan osastolla. Käytetyn DNA:n konsentraatio fosfaattiryhmää kohden oli 2,5183 mM ja nukleotidin keskimääräinen moolimassa 325 g/mol.

Fluoresoivana merkkiaineena käytettiin etidiumbromidia (kuva 2.4. Sigma-Aldrichilta (St. Louis, MO, USA)). Käytetty liuos oli laimennettu vahvemmassa kantaliuksesta veteen siten, että liuoksen konsentraatio oli 0,5072 mM.

Näyteliuokset valmistettiin seuraaviin kolmeen puskuriin: MES-HEPES-puskurit pH-arvoilla 5,2 ja 7,4 sekä natriumasetaattipuskuria pH-arvolla 5,2. MES eli 2-(N-morfoliini)etaanisulfonihappo (kuva 3.2.a) ja HEPES eli N-2-hydroksietyylipiperatsiini-N'-2-etaanisulfonihappo (kuva 3.2.b) hankittiin Sigma-Aldrichilta.



a) MES

b) HEPES

Kuva 3.2. Yhdisteiden a) MES ja b) HEPES rakennekaavat (Muokattu lähteistä Sigma-Aldrich Co. 2014 a, Sigma-Aldrich Co. 2014 b).

MES-HEPES puskurissa oli 50 mM HEPES-happoa, 50 mM MES-happoa ja 75 mM NaCl-suolaa. Puskurin pH nostettiin haluttuun arvoon 5 M NaOH-liuoksella. Natriumasetaattipuskuri laimenettiin Milli-Q vedellä Fermentaksen (Millipore, reisistiivisyys $> 18,0 \text{ M } \Omega \text{ cm}$) 3 M perusliuksesta, siten että sen konsentraatioksi saatiin 25 mM. Natriumasetaattipuskuri sisältää asetaattihappoa, HAc, eli etikkahappoa CH_3COOH , ja sen natriumsuolaa eli natriumasetaattia CH_3COONa .

3.2 Puskurien ionivahvuus

Luvussa 2.1 esitettiin, että kompleksin muodostumiseen vaikuttaa myös liuoksen ionivahvuus (Wagner et al. 2005, s. 139). Ionivahvuus I noudattaa yhtälöä

$$I = \frac{1}{2} \sum C_i z_i^2, \quad (3.1)$$

missä C_i on ionin i konsentraatio ja z_i sen varaus (Engel & Reid 2006, s. 232). Tässä luvussa esitetään laskut kaikkien kolmen puskurin ionivahvuuden laskemiseksi.

3.2.1 MES-HEPES-puskurien ionivahvuudet

MES-HEPES puskureissa on MES-happoa ja HEPES-happoa sama määrä, 50 mM kumpaakin. Hapot dissosioituvat yhtälöiden (3.2) ja (3.3) mukaan. Merkinnällä MESH viitataan happoon ja merkinnällä MES^- sen konjugaattiemäkseen.



Näistä HEPES-hapon happovakio on pienempi (Sigma-Aldrich Co. 2014 a, Sigma-Aldrich Co. 2014 b), joten MES-hapon ja HEPES-hapon välistä tasapainovakiota laskettaessa lähdetään tilanteesta, jossa HEPES on täysin protolysoituneena ja HEPES^- toimii emäksenä:



Reaktion (3.4) tasapainovakio K saadaan dissosiaatioreaktioiden tasapainovakioiden suhteena, sillä

$$K = \frac{[\text{MES}^-][\text{HEPESH}]}{[\text{MESH}][\text{HEPES}^-]} = \frac{[\text{MES}^-][\text{H}^+]}{[\text{MESH}]} \times \frac{[\text{HEPESH}]}{[\text{HEPES}^-][\text{H}^+]} = \frac{K_{\text{aM}}}{K_{\text{aH}}}, \quad (3.5)$$

josta saadaan

$$K = 10^{\text{p}K_{\text{aH}} - \text{p}K_{\text{aM}}} = 10^{7,5 - 6,1} \approx 25,1189. \quad (3.6)$$

3.2.1.1 Puskurin MES-HEPES pH 5,2 ionivahvuus

Alkuperäisen MES-HEPES -liuoksen pH nostettiin arvosta 4,63 haluttuun arvoon 5,2 lisäämällä 45 μl 5 M natriumhydroksidia. Liuoksen natriumhydroksidin konsentraatio saadaan laskettua lisätyn natriumhydroksidin määrän ja konsentraation, sekä liuoksen kokonaistilavuuden avulla:

$$C_{NaOH} = \frac{5 \text{ M} \times 45 \times 10^{-6} \text{ l}}{0,04 \text{ l}} = 5,625 \text{ mM.} \quad (3.7)$$

NaOH dissosioituu vesiliuoksessa täysin natrium- ja hydroksidi-ioneiksi. Lisätyt OH^- -ionit reagoivat MES:n happomuodon kanssa reaktioyhtälön mukaisesti:



Tällöin NaOH:n lisäyksen jälkeen MES:n happomuodon konsentraatio pienenee 0,005625 M.

	MESH	+	HEPES ⁻	⇌	MES ⁻	+	HEPESH
C alussa	0,05		0,05		0		0
NaOH-lisäys	0,044375		0,05		0,005625		0
C tp:ssa	0,044375-x		0,05-x		0,005625+x		x

Reaktion tasapainovakio voidaan esittää myös muuttujan x avulla

$$K = \frac{x(x+0,005625)}{(0,044375-x)(0,05-x)}, \quad (3.9)$$

josta saadaan toisen asteen yhtälö muuttujan x suhteen

$$(K - 1)x^2 - (0,094375K - 0,005625)x + 0,044375 \times 0,05K = 0. \quad (3.10)$$

Sijoittamalla tasapainovakion K arvo, saadaan

$$24,1189x^2 - 2,37622x + 0,05573 = 0. \quad (3.11)$$

Toisen asteen yhtälöllä on kaksi ratkaisua

$$x = \frac{-(-2,37622) \pm \sqrt{(-2,37622)^2 - 4 \times 24,1189 \times 0,05573}}{2 \times 24,1189} = \frac{2,37622 \pm 0,519}{48,238} \quad (3.12)$$

$$x = 0,0385 \text{ tai } 0,0600, \quad (3.13)$$

joista jälkimmäinen ratkaisu ei ole mahdollinen, sillä arvo on suurempi kuin MESH ja HEPES⁻ alkukonsentraatiot 0,05 M.

Ionien HEPES⁻ ja MES⁻ konsentraatioiksi saadaan

$$[\text{HEPES}^-] = 0,05 - x = 0,0115 \text{ M} \quad (3.14)$$

ja

$$[\text{MES}^-] = 0,005625 + x = 0,0441 \text{ M.} \quad (3.15)$$

Puskuriin on lisätty myös natriumkloridia 3 mmol, jotta puskuri vastaisi mahdollisimman hyvin veren ominaisuuksia (Siggaard-Andersen et al. 1984, s. 587). Natriumkloridi liukenee täysin veteen, joten kloridi-ionin määrä liuoksessa on sama kuin liuokseen lisätyn suolan määrä:

$$[\text{Cl}^-] = [\text{NaCl}] = \frac{3 \times 10^{-3} \text{ mol}}{0,04 \text{ l}} = 0,075 \text{ M.} \quad (3.16)$$

Natriumionia liuokseen muodostuu suolan lisäksi lisätystä natriumhydroksidista:

$$[\text{Na}^+] = [\text{NaCl}] + [\text{NaOH}] = \frac{3 \times 10^{-3} \text{ mol}}{0,04 \text{ l}} + \frac{5 \text{ M} \times 45 \times 10^{-6} \text{ l}}{0,04 \text{ l}} = 0,0806 \text{ M} \quad (3.17)$$

Puskuriin lisättiin myös 8 µl 5 M vetykloridia pH:n säädön yhteydessä. Vetykloridi hajoaa vesiliuoksessa täysin ioneiksi, joten pH-arvolla 5,2 puskuriliuoksessa on lisäksi 1 mM kloridi-iona. Puskurin ionivahvuus saadaan nyt laskettua yhtälön (3.1) avulla:

$$\begin{aligned} I_{\text{MES-HEPES pH } 5,2} &= \frac{1}{2} ([\text{MES}^-] + [\text{HEPES}^-] + [\text{Cl}^-] + [\text{Na}^+]) \\ &= \frac{1}{2} (0,0441 \text{ M} + 0,0115 \text{ M} + 0,076 \text{ M} + 0,0806 \text{ M}) \\ &\approx 0,106 \text{ M} \end{aligned}$$

3.2.1.2 Puskusrin MES-HEPES pH 7,4 ionivahvuus

Puskurin pH nostettiin arvosta 4,63 haluttuun arvoon 7,4 lisäämällä 506 µl 5 M natriumhydroksidia. Natriumhydroksidin konsentraatio saadaan yhtälöstä

$$C_{\text{NaOH}} = \frac{5 \text{ M} \times 506 \times 10^{-6} \text{ l}}{0,04 \text{ l}} = 0,06325 \text{ M.}$$

Kuten pH-arvon 5,2 tapauksessa OH^- ionit reagoivat ensin puskurin komponenttien kanssa. Koska natriumhydroksidin konsentraatio on suurempi kuin MESH:n aslkukonsentraatio, kaikki MESH kuluu ja jäljelle jää vielä 0,01325 M OH^- -ioneja. Nämä reagoivat HEPES:n happomuodon kanssa

	MESH	+	HEPES ⁻	⇌	MES ⁻	+	HEPESH
C alussa	0,05		0		0		0,05
NaOH lisäys	0		0,01325		0,05		0,03675
C tp:ssa	x		0,01325+x		0,05-x		0,03675-x

Reaktiion tasapainovakio muuttujan x avulla

$$K = \frac{(0,05-x)(0,03675-x)}{x(0,01325+x)}.$$

Yhtälöstä saadaan toisen asteen yhtälö muuttujan x suhteen

$$(K - 1)x^2 + (0,01325K + 0,05 + 0,03675)x - 0,05 \times 0,03675 = 0. \quad (3.18)$$

Sijoittamalla tasapainovakion K arvo 25,1189 saadaan yhtälö

$$24,1189x^2 + 0,4196x - 0,0018 = 0, \quad (3.19)$$

josta saadaan toisen asteen yhtälön ratkaisukaavan avulla kaksi ratkaisua

$$x = \frac{-(0,4196) \pm \sqrt{(0,4196)^2 - 4 \times 24,1189 \times 0,0018}}{2 \times 24,1189} = \frac{-0,4196 \pm 0,5944}{48,238} \quad (3.20)$$

$$x = 0,0036 \text{ tai } -0,0210 \quad (3.21)$$

joista jälkimmäinen on negatiivinen ja ei kelpaa ratkaisuksi.

Ionien HEPES⁻ ja MES⁻ konsentraatiot saadaan laskettua

$$[\text{HEPES}^-] = 0,01325 + x = 0,0169 \quad (3.22)$$

ja

$$[\text{MES}^-] = 0,05 - x = 0,0464 \text{ M}. \quad (3.23)$$

Puskuriin on lisätty myös natriumkloridia 3 mmol, jotta puskuri vastaisi mahdollisimman hyvin veren ominaisuuksia (Siggaard-Andersen et al. 1984, s. 587). Natriumkloridi liukenee täysin veteen, joten kloridi-ionin määrä liuoksessa on sama kuin liuokseen lisätyn suolan määrä:

$$[\text{Cl}^-] = [\text{NaCl}] = \frac{3 \times 10^{-3} \text{ mol}}{0,04 \text{ l}} = 0,075 \text{ M}. \quad (3.24)$$

Natriumionia liuokseen muodostuu suolan lisäksi lisätystä natriumhydroksidista:

$$[\text{Na}^+] = [\text{NaCl}] + [\text{NaOH}] = \frac{3 \times 10^{-3} \text{ mol}}{0,04 \text{ l}} + \frac{5 \text{ M} \times 506 \times 10^{-6} \text{ l}}{0,04 \text{ l}} = 0,138 \text{ M} \quad (3.25)$$

MES-HEPES-puskuriin pH-arvolla 7,4 lisättiin 8 µl 5 M vetykloridia, kuten pH-arvolla 5,2, joten puskuriliuoksessa on lisäksi 1 mM kloridi-onia. Puskurin ionivahvuus saadaan nyt laskettua yhtälön (3.1) avulla:

$$\begin{aligned} I_{\text{MES-HEPES pH } 7,4} &= \frac{1}{2} ([\text{MES}^-] + [\text{HEPES}^-] + [\text{Cl}^-] + [\text{Na}^+]) \\ &= \frac{1}{2} (0,0464 \text{ M} + 0,0169 \text{ M} + 0,076 \text{ M} + 0,138 \text{ M}) \\ &\approx 0,138 \text{ M}. \end{aligned}$$

3.2.2 NaAc puskurin ionivahvuus

Natriumasetaattipuskurissa pH-arvolla 5,2 on natriumasetaatin (NaAc) ja etikkahapon (HAc) konsentraatioiden suhde 79/21 (Dean 1999, s. 8.111):

$$\frac{[\text{NaAc}]}{[\text{HAc}]} = 3,762. \quad (3.26)$$

Käytetty puskuri oli 25 mM, eli

$$[\text{NaAc}] + [\text{HAc}] = 25 \text{ mM}. \quad (3.27)$$

Suola dissosioituu täysin, joten natrium-ionin konsentraatioksi saadaan

$$[\text{Na}^+] = [\text{NaAc}] = 19,750 \text{ mM}. \quad (3.28)$$

Tasapainotilanteessa Hendersson-Hasselbalchin yhtälön mukaan

$$\frac{[\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]} = 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}. \quad (3.29)$$

Koska suola on dissosioitunut täysin, yhtälö $[\text{NaAc}] = [\text{Ac}^-]$ pätee, jolloin yhtälöiden (4.31) ja (4.33) avulla saadaan asetaatti-ionin konsentraatio pH-arvossa 5,2, kun etikkahapon $\text{p}K_a$ -arvo on 4,74 (Zumdahl 2002, s. 229):

$$[\text{Ac}^-] = \frac{25 \text{ mM} \times 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{p}K_a}} = \frac{25 \text{ mM} \times 10^{5,2 - 4,74}}{1 + 10^{5,2 - 4,74}} = 18,6 \text{ mM}. \quad (3.30)$$

Asetaattipuskurin (pH 5,2) ionivahvuudeksi saadaan yhtälön (3.1) mukaan

$$I_{\text{NaAc pH } 5,2} = \frac{1}{2} (19,75 \text{ mM} + 18,6 \text{ mM}) = 0,0191567 \text{ M} \approx 0,019 \text{ M}.$$

3.3 Näytteiden valmistus

DNA:n ja peptidin suhdetta kontrolloitiin N/P-suhteella, eli peptidin aktiivisten amiini- (N-ryhmien) konsentraation suhde DNA:n fosfaattiryhmien (P-ryhmien) konsentraatioon. Tällaisen peptidin ja DNA:n suhteen määritelmän avulla voitiin verrata peptidin sitoutumista DNA:han eri pH-arvoilla ja verrata sen käyttäytymistä usein käytettyihin kationisiin polymeereihin. Mittauksissa käytettiin N/P-suhteita välillä 0,2-16,0.

Näytteissä oli ETI:DNA-suhde 1:15, jolloin kaikki ETI on interkaloitunut DNA:han. Näytteet tehtiin 5 mm kyvetiin puskuriliuokseen. Kyvetiin mitattiin aluksi DNA-, ETI- ja puskuri-liuoksia taulukon 3.1. osoittamat määrät.

Taulukko 3.1. ETI-DNA-liuoksen valmistus.

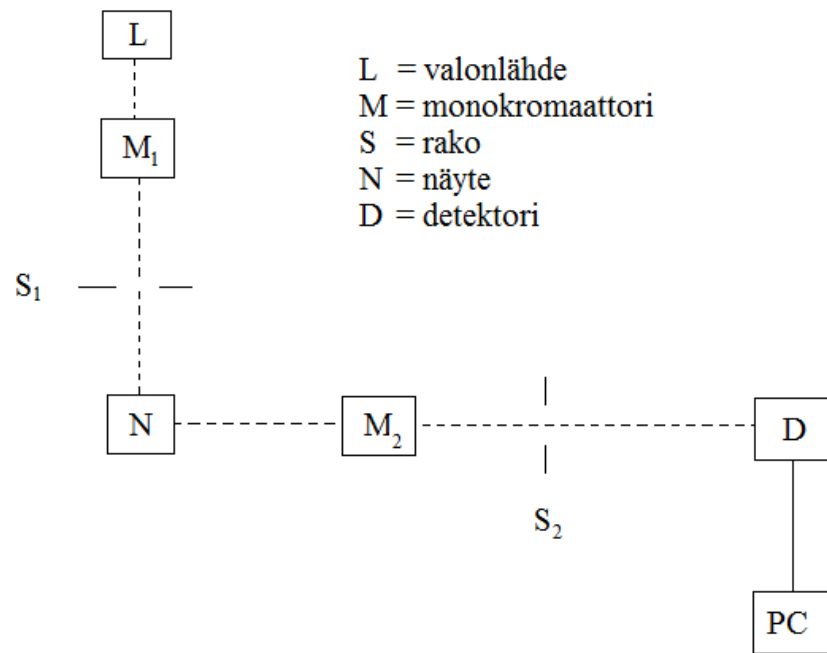
Ainesosa	Määrä (μl)
Puskuri	170,8
DNA (c = 2,5183 mM)	59,6
ETI (c = 0,5072 mM)	19,7

Seuraavaksi kyvetiin lisättiin DNA-ETI-liuoksen lisäksi yhtä suuri tilavuus, 250 μl, peptidi-puskuriliuosta ja sekoitettiin huolellisesti. Tämä sarjansa ensimmäinen näyte oli aina laimea peptidinäyte, N/P-suhde 0,2-0,6. Seuraavassa peptidilisäyksessä N/P-suhde nostettiin haluttuun vaiheittaisella lisäysmenetelmällä, eli kyvetiin lisättiin sopiva määrä peptidiä, jolloin saatiin haluttu N/P-suhde seuraavaa mittausta varten. Lisäyksiä mahduttiin kyvetiin kolme tai neljä, riippuen peptidin määrästä.

3.4 Kokeelliset menetelmät

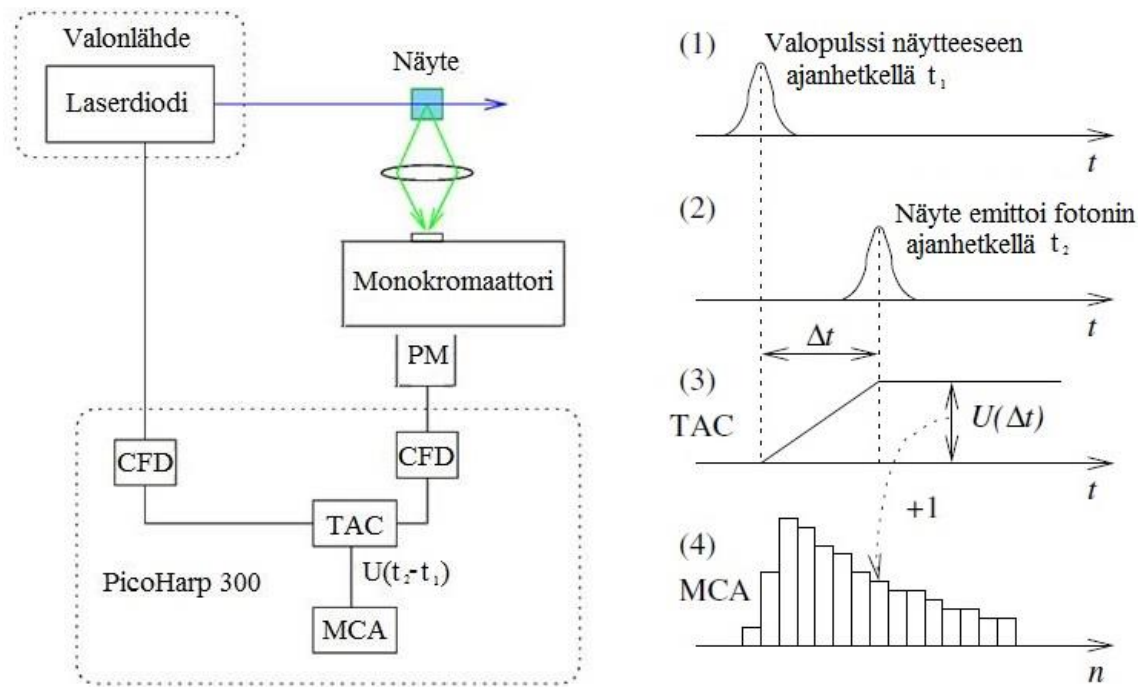
Absorption mittaamiseen käytettiin spektrofotometriä UV-3600 (Shimadzu, Kioto, Japani). Vapaan ja interkaloituneen ETI:n ja absorptiospektri mitattiin aallonpituusalueella 300–700 nm ja spektristä määritettiin absorptio aallonpituudella 483 nm suhteellisen kvanttisuhteen laskemista varten.

Emissiospektrit mitattiin spektrofluorometrillä (Fluorolog-3-111, Horiba, Pariisi, Ranska). Spektrofluorometrin toimintaperiaate on esitetty kuvassa 3.3. Sen valonlähteenä L on xenon-lamppu (450 W), josta valo kulkee viritysmonokromaattorin M_1 kautta ulostuloraolle S_1 . Näytteen emittoima säteily kerätään linssien avulla emissiomonokromaattorin M_2 ja raon S_2 kautta detektorille. Mitattaessa emissiospektriä valittiin viritysaallonpituudeksi 480 nm ja emissioaallonpituus oli välillä 500–800 nm. Integraatioajaksi valittiin 0,1 s ja kummankin raon leveys oli 2 nm.



Kuva 3.3. Spektrofluorometrin toimintaperiaatekuva.

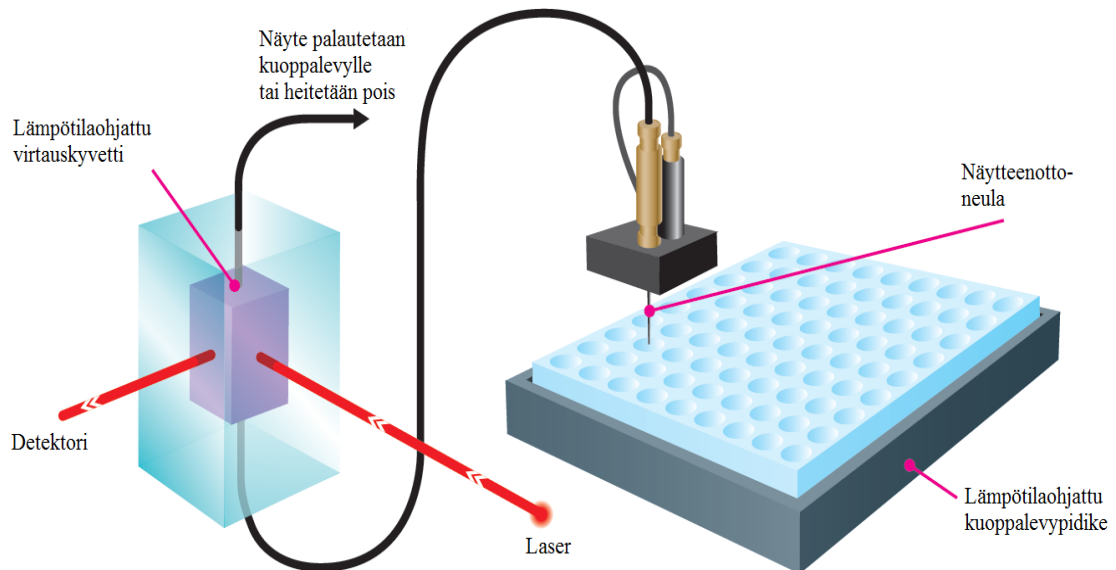
Kuvassa 3.4. on kaaviokuva käytetystä aikaerotteisesta fluoresenssispektrofotometrillä, eli TCSPC-laitteistosta (engl. time-correlating single photon counting). Laitteiston pääkomponentit ovat valonlähde (pulssitettu laseriodi LDH-P-485), PicoHarp 300 -moduuli (PicoQuant, Berliini, Saksa) ja detektori. Laitteiston detektorissa on monokromaattori, joka päästää vain tietyn aallonpituisten fotonit valomonistinputkelle (engl. photomultiplier tube, PM), joka rekisteröi signaalit. TCSCP-moduli yhdistää toisiinsa diskriminaattorin (engl. constant fraction discriminator, CFD), aika-amplitudi muuntimen (engl. time-to-amplitude converter, TAC) ja monikanava-analysaattorin (engl. multichannel analyser, MCA).



Kuva 3.4. TCSPC (Time-correlated single-photon counting)-laitteiston kaaviokuva vasemmalla ja aikadiagrammi laitteiston toimintaperiaatteesta. Detektori koostuu monokromaattorista ja valomonistinputkesta (PM). PicoHarp 300 moduuli koostuu diskriminaattorista (CFD), aika-amplitudi muuntimesta (TAC) ja monikanava-analysaattorista (MCA). (Muokattu lähteestä Tkachenko, s. 112).

Virittävän valopulssin kanssa samanaikaisesti lähtee mittauksen aloittava sähköimpulssi diskriminaattorin kautta aika-amplitudimuuntimelle. Näytteen molekyylien virittyessä ne emittoivat fluoresenssifotoneita. Ensimmäisen emittoituneen fotonin saavuttua valomonistinputkelle se synnyttää sähköimpulssin, joka lähetetään diskriminaattorin kautta aika-amplitudimuuntimelle ja joka lopettaa mittaamisen. Aika-amplitudimuunnin generoi pulssin, jonka amplitudi on suoraan verrannollinen aika-amplitudimuuntimelle saapuneiden impulssien saapumisaikojen eroon, viiveeseen. Tämä toistetaan jatkuvasti fotonin toinen toisensa jälkeen. Monikanava-analysaattorissa on monta yksikanava-analysaattoria ja analysaattori lokeroi saapuvat pulssit ja laskee kuinka monta kutakin pulssia tulee. Pulssien lokerointi tapahtuu amplitudin perusteella ja amplitudi on suoraan verrannollinen laserista lähtevän fotonin lähtöajan ja detektroille saapuvan fotonin saapumisaian eroon. Tuon eron määrittää tutkittavan aineen fluoresenssi-ilmiön nopeus, eli elinikä. SPC-menetelmä perustuu todennäköisyyteen havaita fotonin, sillä fotonin havaitsemistodennäköisyys jollakin ajanhetkellä t virityspulssin jälkeen on suoraan verrannollinen fluoresenssin intensiteettiin sillä kyseisellä hetkellä. (Valeur, s. 173).

Nanopartikkelien koot määritettiin dynaamiseen valon sirontaan perustuvalla DLS-tekniikalla (dynamic light scattering) Zetasizer APS (Malvern, Englanti) laitteella. Zetasizer APS -laite ottaa näytteen kuoppalevyiltä kyvetiin ja säteilyttää kyvetissä olevaa näytettä 830 nm:n laserilla (60 mW) (kuva 3.5.) (Malvern Instruments Ltd. 2010).



Kuva 3.5. Zetasizer APS laitteen toimintaperiaatekuva. Laite ottaa näytteen kennolevyllä kyvettiin ja sitä säteilytetään 830 nm:n laserilla. (Muokattu lähteestä Malvern Instruments Ltd 2010).

Näytettä valaistaan ja sirontakuviota tutkitaan ajan funktiona, jolloin voidaan määrittää partikkelien diffuusionopeudet. Diffuusionopeudesta voidaan määrittää näytteen polydispersiteetti-indeksi, Pdi, ja kokojakauma. Pdi saa arvoja välillä 0–1, ja se kuvaa näytteen partikkelien kokojakaumaa. Jos Pdi-arvo on pieni, näytteessä on vain yksi populaatio, eli vain yhden kokoisia partikkeleita, ja näytteen hajonta on pientä. Kun Pdi-arvo kasvaa, näytteessä voi olla useampia populaatioita tai kokojakauma on leveä. Diffuusionopeudesta voidaan määrittää myös Stokes-Einstein-yhtälön avulla partikkelien hydrodynaaminen halkaisija, d_H , kun tunnetaan näytteen lämpötila, T , ja puskurin viskositeetti, η :

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}, \quad ()$$

missä k on Boltzmannin vakio. Hydrodynaaminen halkaisija on mallinnuskeino epä-säännöllisen muotoisille partikkeleille. Hydrodynaaminen halkaisija d_H on pyöreän kovan pallon halkaisija, jolla on sama diffuusiokerroin D . Käytännössä hydrodynaaminen halkaisija sisältää partikkelin lisäksi myös siihen kiinnittyneet vesimolekyylit. Laitteen valmistaja lupaa laitteen hydrodynaamisen halkaisijan mittausalueeksi 0,3–2000 nm.

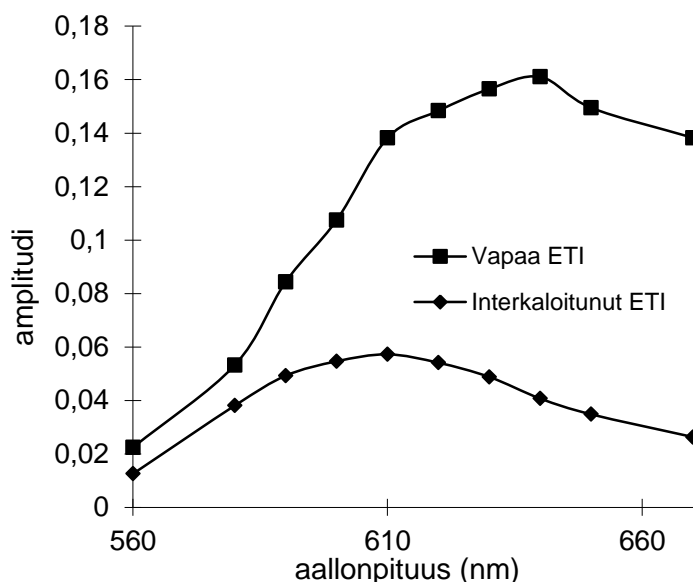
Partikkelikokomittauksissa kuoppalevyille lisättiin 30 μ l DNA-puskuriliuosta ja 30 μ l peptidi-puskuriliuosta, paitsi N/P-suhteella 26, jolloin näytteessä oli DNA-liuosta 19 μ l ja peptidiliuosta 41 μ l. Mittauksia tehtiin N/P-suhteella 0,2; 0,6; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 8,0; 16,0 ja 26,0. Kaikilla N/P-suhteilla mitattiin ainakin yksi näyte välittömästi valmistamisen jälkeen ja sama näyte useamman tunnin kuluttua. Mittausteknisistä syistä aika vaihteli välillä 8–16 tuntia.

4 TULOKSET

Tässä luvussa käydään läpi työn tuloksia. Ensin käydään läpi sitoutuneen DNA:n osuuden riippuvuus peptidin määrästä ja DNA-peptidipartikkeleiden koko. Työn pääpaino on DNA-peptidipartikkelien sitoutumisvakioissa, joten niihin keskitytään enemmän, ja lopuksi verrataan eri puskureiden ionivahvuuksia.

4.1 Komponenttispекtrit

DNA-peptidipartikkelien muodostumista tutkittiin eri N/P-suhteilla. Jokaisen näytteen fluoresenssin vaimenemiskäyrät sovitettiin samanaikaisesti kaksiekspontiaaliseen yhtälöön (2.18). Vapaan ETI:n suhteellinen kvanttisuhde laskettiin yhtälön (2.12) mukaisesti. Suhteelliseksi kvanttisuhteeksi saatiin MES-HEPES-puskureissa 0,130 ja 0,136 (pH-arvoilla 5,2 ja 7,4) ja NaAc puskurissa 0,121 (pH-arvolla 5,2). Suhteellisen kvanttisuhteen ja yhtälön (2.18) perusteella määritettiin DAS-kuvaajat. Kuvassa 4.1. on esitetty N/P-suhteen 1,0 DAS-kuvaaja MES-HEPES-puskurissa pH-arvolla 7,4. DAS-kuvaajien komponenttispекtrien pinta-alojen avulla voidaan määrittää sitoutuneen DNA:n osuus yhtälön (2.20) avulla.

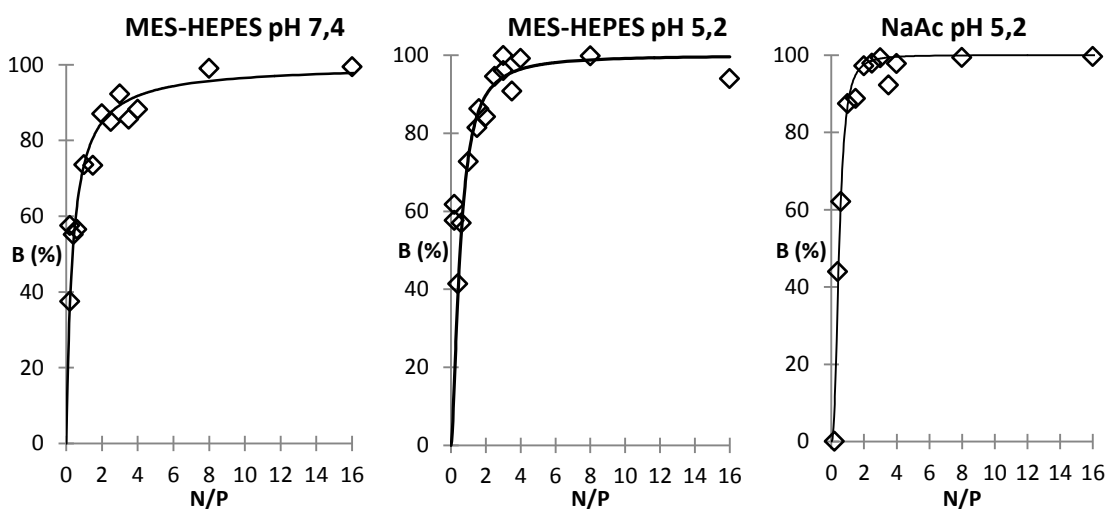


Kuva 4.1. Peptidin $(KK)_2KGGC$ DAS-kuvaaja N/P-suhteella 1,0 MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4. DAS-kuvaajassa on vaimenemiskäyrien pre-eksponentiaalikertoimet, eli amplitudit, aallonpituuden funktiona. Spektrit on korjattu ETI:n suhteellisella kvanttisuhteella. Kyseisessä näytteessä vapaan ETI:n elinaika on 1,39 ns, interkaloituneen ETI:n 23,38 ns ja sitoutuneen DNA:n osuus on 26,4 %.

DAS-kuvaajissa pitkäikäisemmän komponentin spektrin maksimi on 610 nm:n kohdalla, kuten DNA:han interkaloituneen ETI:n fluoresenssimaksimi (kuva 4.1.). Lyhytikäisemmän komponentin maksimi on noin 630 nm, kuten vapaan ETI:n fluoresenssimaksimi.

4.2 Peptidin amiiniryhmiin sitoutuneen DNA:n osuus

DAS-kuvaajien komponenttipektrien pinta-alojen avulla lasketaan sitoutuneen DNA:n osuus, yhtälön (2.20) mukaisesti. Kuvassa 4.2. sitoutuneen DNA:n osuus on esitetty N/P-suhteen funktiona kaikissa kolmessa puskurissa.



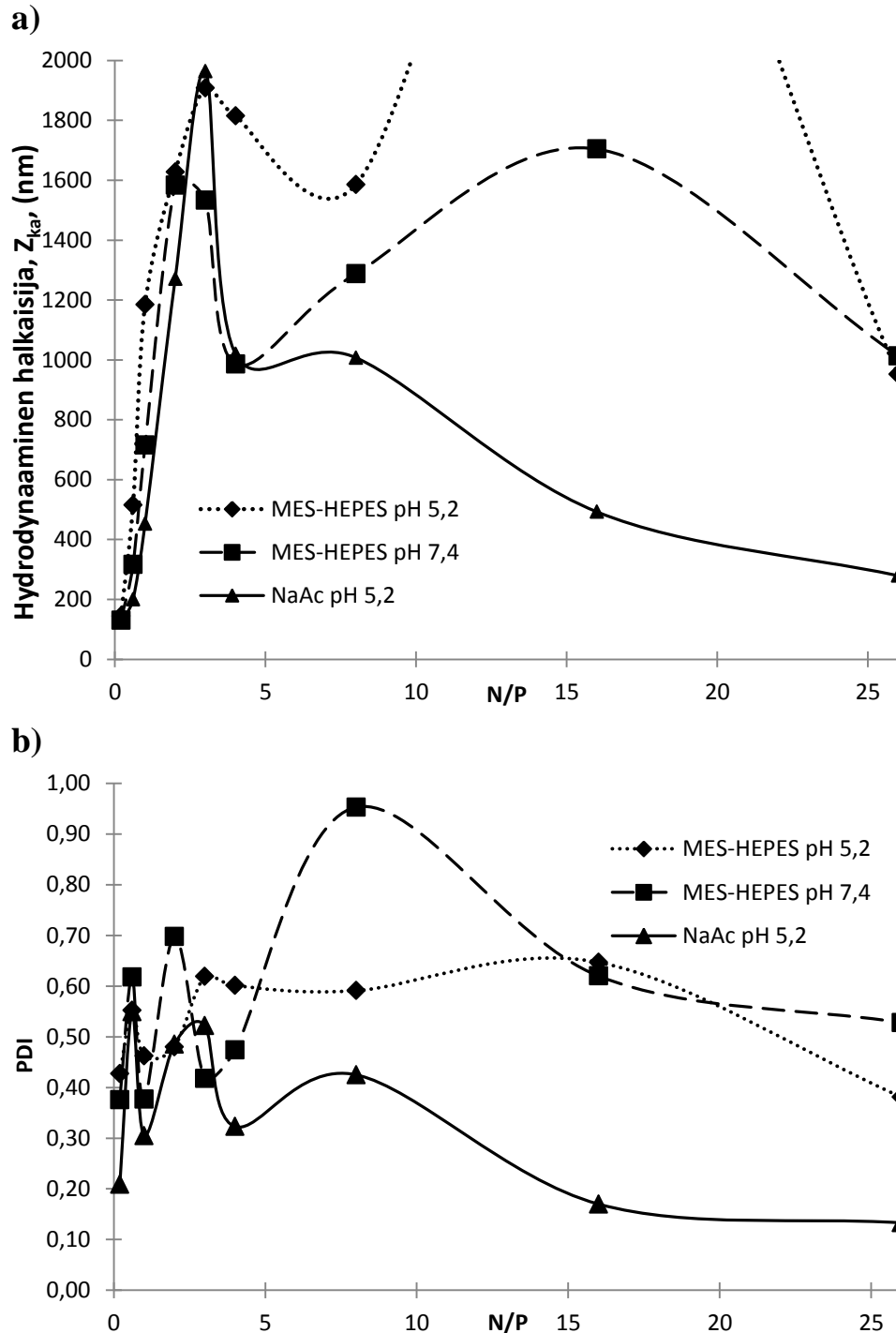
Kuva 4.2. Saturoitumis isotermi, eli sitoutuneen DNA:n osuus N/P-suhteen funktiona MES-HEPES puskureissa pH-arvoilla 7,4 ja 5,2 sekä NaAc puskurissa pH-arvolla 5,2.

MES-HEPES-puskurissa pH-arvolla 7,4 N/P-suhteen ollessa 8 kaikki DNA vaikuttaa olevan sitoutuneessa muodossa, sillä sitoutuneen DNA:n määrä ei enää kasva. Alemmillä pH-arvoilla saturoituminen saavutetaan jo pienemmillä N/P-suhteen arvoilla. Natriumasetaattiliuoksessa DNA-peptidi-partikkelin muodostuminen on tehokkainta, saturoituminen saavutetaan jo N/P-suhteella 2.

Elektroforeesikokeissa pH-arvolla 7,3 DNA-peptidikompleksin varaus muuttuu positiiviseksi N/P-arvolla 8 (Plank et al. 1999, s. 324), tällöin DNA-peptidipartikkelin ydin on valmis ja lähes kaikki DNA:n negatiiviset fosfaatit ovat sitoutuneita. Plankin tulos tukee tämän tutkimuksen tulosta, sillä DNA-peptidin varaus muuttuu positiiviseksi samalla N/P-arvolla kuin tämän tutkimuksen mukaan kaikki DNA on sitoutuneessa muodossa. Fluoresenssimenetelmällä ei voida tutkia peptidiylimäärän vaikutusta, sillä kaikki ETI on jo vapaana liuoksessa. Peptidiylimäärän vaikutusta voidaan tutkia partikkelikomittauksen avulla.

4.3 DNA-peptidipartikkelin koko

Partikkelikokomittauksissa huomattiin, että peptidiylimäärä vaikuttaa DNA-peptidikompleksin kokoon. Kuvassa 4.3.a on esitetty näytteissä olevien partikkelien hydrodynaamisen halkaisijan keskiarvo, Z_{ka} , eri N/P-suhteilla keskimäärin 35 minuutin ikäisillä näytteillä. Näytteiden Pdi-arvot olivat keskimäärin 0,48.



Kuva 4.3. Hydrodynaamisen halkaisijan keskiarvo (Z_{ka}) eri N/P-suhteilla kolmessa eri puskurissa (a) sekä näytteiden polydispersiteetti-indeksi, eli Pdi-arvo (b). Laitteen mittausalue on 0,3–2000 nm. Mittaukset suoritettiin keskimäärin 35 minuutin kuluttua näytteen valmistaminen jälkeen.

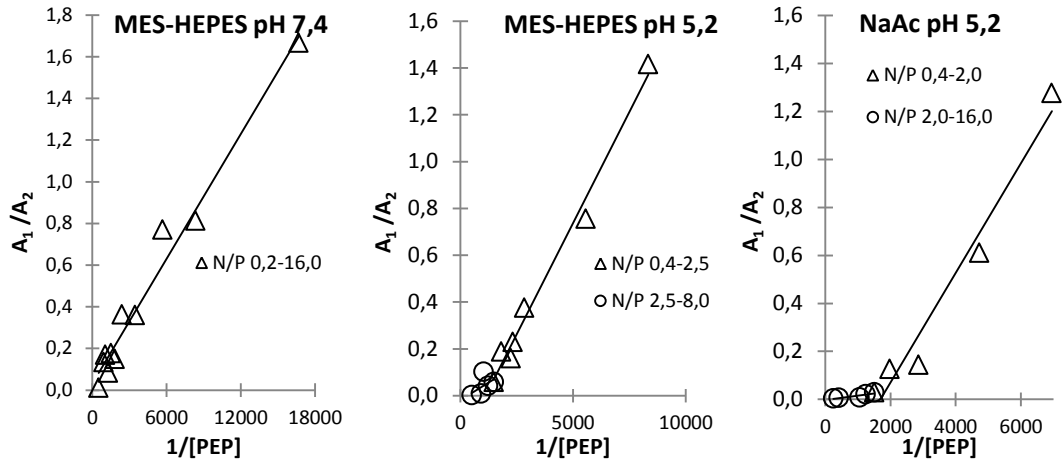
Pienillä N/P-suhteilla, kun kompleksi on negatiivisesti varautunut, partikkelikoko kasvaa kun peptidiä lisätään. Kun N/P-suhde on pienempi kuin kaksi, partikkelikokojakauksissa ei ole juuri eroa eri puskureiden välillä. Kun lähes kaikki DNA:n fosforiryhmät ovat sitoutuneet, kompleksi on sähköisesti neutraali. Tällöin muodostuneet partikkelit eivät hylji toisiaan ja pystyvät muodostamaan yhteenliittymiä ja partikkeleiden koon tulisi olla suurimmillaan. Kun peptidiä lisätään vielä, kompleksista tulee positiivisesti varautunut ja sen koko yleensä pienenee. Asetaattipuskurissa näin käykin: maksimi havaitaan kun N/P-suhde on kolme ja suuremmilla N/P-suhteilla partikkelikoko pienenee aina 280 nm:iin asti. Sen sijaan MES-HEPES puskureissa partikkelikoko ei pienene alle 1000 nm:n ja suurilla N/P-suhteilla partikkelikoko lähtee uudestaan kasvamaan. Lisäksi MES-HEPES puskurissa, pH-arvolla 7,4 ensimmäinen maksimi havaitaan jo N/P-suhteen arvolla kolme, vaikka sitoutumisisotermi ja Plankin (1999) mukaan maksimin pitäisi havaita vasta kun N/P-suhde on kahdeksan. Näyttääkin siltä, että MES-HEPES puskureissa partikkelit muodostavat yhteenliittymiä myös suurilla N/P-suhteilla, ja se vaikuttaa partikkelikoon keskiarvoon. Tämä selittyy kuvassa 2.1. esitetyllä suolan vaikutuksella, sillä MES-HEPES-puskureiden ionivahvuus on suurempi kuin asetaattipuskurissa. Zetasizer APS -laitteella pystytään määrittämään halkaisijan arvo 2000 nm:n saakka, MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 5,2 partikkelikoon keskiarvo ylittää laitteen rajan N/P-suhteella 16,0.

Asetaattipuskurissa partikkelikokojakauksen polydispersisyys kasvaa N/P-suhteen funktiona N/P-suhteen ollessa 0,6–3,0, sillä näytteissä on useita populaatioita. Näytteiden Pdi-arvo laskee N/P-suhteen ollessa yli 3,0. MES-HEPES puskureiden tapauksessa käännekohta on vasta N/P-arvolla 8,0 joskin matalimman arvon Pdi-arvo saa N/P-suhteella 1,0. Kuvassa 4.3.b on piirretty keskimääräinen Pdi-arvo N/P-suhteen funktiona.

Myöhemmin mitatuissa näytteissä DNA-peptidikompleksien koot olivat erittäin polydispersisiä, eli näytteissä oli hyvin monen kokoisia partikkeleita. Tällöin näytteiden Pdi-arvojen keskiarvo oli 0,6 arvojen vaihdellessa välillä 0,08–0,96. Siksi keskiarvoa ei voida pitää luotettavana tapana esittää partikkelikokoa pitkäikäisillä näytteillä. Lisäksi pitkäikäisillä näytteillä suurimmat partikkelikasaumat olivat vajonneet näytteen alaosaan. Mittalaite ei sekoita näytettä mitatessaan, jolloin suurimmat partikkelit eivät tulleet mukaan mittaukseen ja tämä osaltaan lisää virhettä pitkäikäisten näytteiden partikkelikooissa. Suuremmilla N/P-suhteilla Pdi-arvo kasvaa ajan funktiona. MES-HEPES puskureissa Pdi arvo kasvaa nopeammin ajan funktiona kuin NaAc-puskurissa. Asetaattipuskurissa Pdi arvot ovat systemaattisesti pienempiä kuin MES-HEPES puskureissa. Tämäkin selittyy suolan vaikutuksella, sillä asetaattipuskurin suolapitoisuus oli pienempi kuin MES-HEPES puskureiden ja siksi asetaattipuskurissa partikkelit eivät muodosta niin helposti kasaumia. Pienillä N/P-suhteilla partikkelikoossa ei näy muutosta ajan kuluessa.

4.4 Sitoutumisvakiot

Riippumattoman teorian mukainen sitoutumisvakio K_r voidaan määrittää kun piirretään yhtälön (2.26) mukaisesti sitoutuneen ja sitoutumattoman DNA:n suhde amiinikonsentraation käänteisluvun funktiona (Kuva 4.4.).



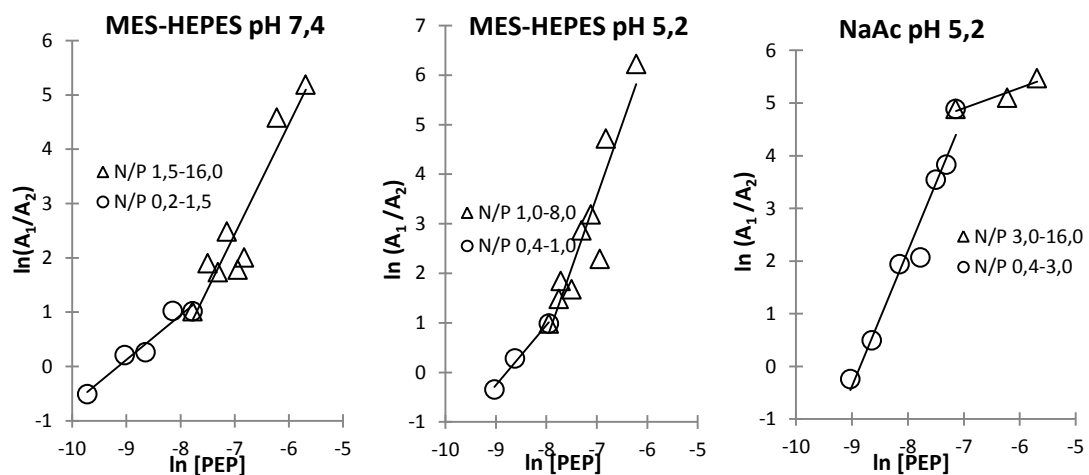
Kuva 4.4. Sitoutuneen ja sitoutumattoman DNA:n suhde, A_1/A_2 , amiinikonsentraation käänteisluvun, $1/[PEP]$, funktiona eri puskureissa. Suoran kulmakertoimen käänteisluku on sitoutumisvakio K_r amiiniryhmää kohti.

Sitoutuneen ja sitoutumattoman DNA:n suhde A_1/A_2 vakioituu happamissa liuoksissa N/P-suhteella 2,0–2,5. MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4 saturoituminen tapahtuu vasta myöhemmin eikä siksi näy hyvin kuvassa. Riippumattoman teorian mukainen tasapainovakio K_r lasketaan suoran kulmakertoimesta yhtälön (2.26) avulla. Taulukossa 4.2. on esitetty eri puskureiden sitoutumisvakiot K_r amiiniryhmää kohti. Riippumattoman teorian mukainen tasapainovakio K_r on MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4 kaksi kertaa isompi kuin MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 5,2. Molemmissa puskureissa, joiden pH-arvo on 5,2 tasapainovakiot K_r ovat melko lähellä toisiaan.

Taulukko 4.2. Puskurien ionivahvuudet sekä DNA-peptidikompleksin sitoutumisvakioita eri puskureissa. Riippumattoman teorian mukainen sitoutumisvakio amiiniryhmää kohti K_r , Hill:n yhtälön kooperatiivisuustekijä α sekä kokonaissitoutumisvakio $(K_{ko})^\alpha$ ja keskimääräinen sitoutumisvakio amiiniryhmää kohti K_{ko} .

Puskuri	Puskurin ionivahvuus	Riippumaton teoria		Kooperatiivinen teoria		$(K_{ko})^\alpha$	K_{ko}
		K_r	N/P alue	α			
MES-HEPES pH 7,4	0,138 M	10010	0,2-1,5 1,5-16,0	0,82 2,03	1836 $1,67 \times 10^7$	9395 3639	
MES-HEPES pH 5,2	0,106 M	5263	0,4-1,0 1,0-8,0	1,21 2,90	42436 $2,29 \times 10^{10}$	6533 3730	
NaAc pH 5,2	0,019 M	4374	0,4-3,0	2,57	$7,54 \times 10^9$	6994	

Kun piirretään $\ln \frac{A_1}{A_2}$ amiinikonsentraation logaritmin funktiona, suoran leikkauspisteestä saadaan sitoutumisvakio K_{ko} ja kulmakertoimesta saadaan kooperatiivisuusaste α Hill'in yhtälön (2.33) mukaisesti. Kuvassa 4.4. on esitetty Hill'in kuvaajat eri puskureissa. Taulukossa 4.a. on esitetty eri puskurien Hill'in yhtälön kooperatiivisuuden asteet α sekä kokonaissitoutumisvakiot $(K_{ko})^\alpha$ ja keskimääräiset sitoutumisvakiot amiiniryhmää kohti K_{ko} .



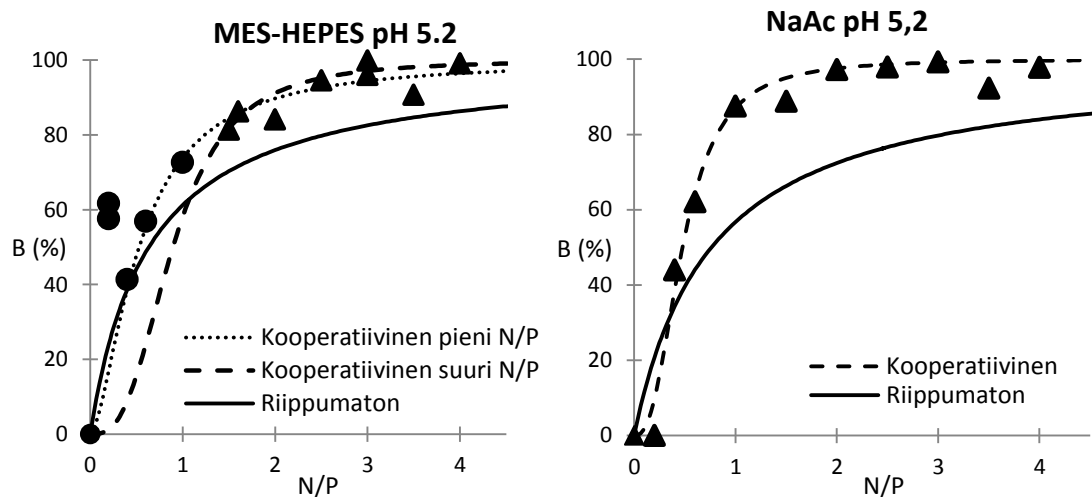
Kuva 4.4. Hill:n kuvaaja, eli sitoutuneen DNA:n ja sitoutumattoman DNA:n suhteen logaritmi, $\ln \frac{A_1}{A_2}$, amiinikonsentraation logaritmin, $\ln[PEP]$, funktiona eri puskureissa.

Hill'in kuvaajat eivät ole suoria, vaan niissä havaitaan kaksi vaihetta. MES-HEPES puskureissa pH-arvoilla 5,2 ja 7,4 käännekohta havaitaan N/P-suhteen arvolla 1,0 ja 1,5, vastaavasti. Tätä alhaisemmilla N/P-suhteilla sitoutuminen on lähes riippumatonta, sillä kooperatiivisuuden astetta kuvaava kerroin α saa arvot lähellä yhtä (Taulukko 4.2.).

Myös keskimääräiset sitoutumisvakiot amiiniryhmää kohden ovat lähes samat kuin riippumattomat sitoutumisvakiot. Käännekohtan arvoja suuremmilla N/P-suhteilla sitoutuminen on selvästi kooperatiivista. Kooperatiivinen vakio α on 2,03 puskurissa jonka pH-arvo on 7,4 ja pH-arvolla 5,4 kooperatiivinen vakio on jopa 2,9. Kokonaissitoutumisvakiot $(K_{ko})^\alpha$ ovat huomattavasti suuremmat kuin riippumattoman teorian mukaiset sitoutumisvakiot. MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4 kooperatiivisen teorian mukainen kokonaissitoutumisvakio on $1,67 \times 10^7$ ja pH-arvolla 5,2 kokonaissitoutumisvakio on $2,29 \times 10^{10}$.

NaAc-puskurissa Kuvan 4.4. kuvaaja koostuu myös kahdesta osasta, mutta NaAc-puskurissa ei havaita riippumatonta vaihetta. Kooperatiivisen sitoutumisen tasapainovakio amiiniryhmää kohti K_{ko} ja kooperatiivisuusaste α määritetään käännepistettä pienemmillä peptidikonsentraatioilla. Tätä suuremmilla peptidikonsentraatioilla kaikki ETI on jo vapaana, jolloin kuvaajasta ei voida enää päätellä vakioita. NaAc-puskurissa kooperatiivisen teorian mukainen kokonaissitoutumisvakio on $7,54 \times 10^9$ ja kooperatiivinen vakio α on 2,57. Nämä arvot ovat hieman pienempiä kuin MES-HEPES puskurissa pH:n ollessa 5.2, mutta huomattavasti suurempia kuin pH:n ollessa 7.4.

Tarkastelemalla sitoutuneen DNA:n osuutta N/P-suhteen funktiona, voidaan myös arvioida onko DNA-peptidikompleksin sitoutuminen riippumatonta vai kooperatiivista. Kuvassa 4.5. on piirretty samaan kuvaan riippumattoman teorian ja kooperatiivisen teorian mukaiset teoreettiset kuvaajat käyttäen taulukon 4.2 arvoja sekä mittaustuloksista lasketut sitoutuneen DNA:n osuudet.



Kuva 4.5. Sitoutuneen DNA:n osuus, B , N/P -suhteen funktiona MES-HEPES puskurissa ja NaAc-puskurissa pH-arvolla 5,2. Sitoutuminen MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4 käyttäytyy samankaltaisesti kuin MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 5,2. MES-HEPES puskurissa N/P -suhteilla 0–1 sitoutuminen näyttää noudattavan kooperatiivista teoriaa ja α saa arvon 1,21. Koska kooperatiivinen vakio α on noin yksi, kooperatiivinen ja riippumaton käyrä ovat hyvin samanlaiset. Suuremmilla N/P -arvolla kooperatiivinen vakio α on 2,90 ja mittaustulokset näyttävät noudattavan kooperatiivista teoriaa. NaAc-puskurissa sitoutuminen noudattaa selvästi kooperatiivista teoriaa tekijän α arvolla 2,57.

Sitoutuminen on erilaista eri puskureissa. MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 5,2 sitoutuminen on pienillä N/P -suhteilla lähes riippumatonta ja suuremmilla N/P -suhteilla kooperatiivista. Asetaattipuskurissa pH-arvolla 5,2 sitoutuminen on kooperatiivista jo pienilläkin peptidimäärillä. Koska puskurien pH-arvo on sama, kummassakin puskurissa amiiniryhmien protonoitumisasteet on samat. On ilmeistä, että muutkin ympäristön ominaisuudet vaikuttavat sitoutumiseen pH-arvon lisäksi.

5 TULOSTEN TARKASTELU

Työssä määritettiin fluoresenssimittauksilla sitoutuneen DNA:n osuus eri N/P-suhteilla kolmessa eri puskuriliuoksessa. Mittaustulosten avulla DNA:n ja peptidin sitoutumista mallinnettiin kahdella eri tavalla, ja lisäksi mitattiin DNA-peptidipartikkelien kokoja eri N/P-suhteilla.

Mittaustulosten perusteella happamissa liuoksissa sitoutuneen DNA:n osuus saturoituu jo N/P-arvolla 2,5, kun taas pH-arvolla 7,4 kaikki DNA vaikuttaa olevan sitoutunut vasta N/P-arvolla 8,0. Plank et al. (1999) onkin todennut, että peptidin $(KK)_2KGGC$ ja DNA:n muodostama partikkeli muuttuu negatiivisesta positiiviseksi pH-arvolla 7,3 kun N/P-suhde on 8. Kun DNA-peptidipartikkelilla ei ole varausta, kaikissa DNA:n negatiivisissa fosforiryhmissä on sitoutunut positiivinen amiiniryhmä, mutta amiiniryhmiä ei ole vielä ylimäärin. Plankin et al. (1999) tulos tukee mitattuja sitoutuneen DNA:n osuuden tuloksia. Happamammassa liuoksessa lähes kaikki DNA:n fosforiryhmistä ovat sitoutuneet jo pienemmässä peptidipitoisuudessa. Näin ollen alemmassa pH-arvossa suurempi osuus peptidin amiiniryhmistä on aktiivisia. Tämä tuntuu järkevältä, sillä alemmassa pH:ssa suurempi osa amiiniryhmistä on protonoituneena, sillä amiiniryhmien pK_a -arvot ovat kaikilla aminohapoilla vähintään 8,95 (Parril 1997). Kun pH-arvo on sama kuin pK_a , puolet amiiniryhmistä on protonoituneena. Toisin sanoen, mitä matalampi pH-arvo, sitä korkeampi protonoitumisaste.

Plankin mukaan (1999, s. 327) peptidin $(KK)_2KGGC$ ja DNA:n sitoutumisvakio pH-arvolla 7,0 on $2,09 \times 10^7$. Plankin määrittämä sitoutumisvakio tukee tämän työn tuloksia, sillä kokonaissitoutumisvakioksi $(K_{ko})^\alpha$ saatiin $1,67 \times 10^7$ pH-arvolla 7,4.

MES-HEPES puskureissa sitoutuminen on pienillä N/P-suhteilla riippumatonta, sillä kooperatiivisuuden astetta kuvaava kerroin α saa arvot lähellä yhtä. Pienillä N/P-arvoilla MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4 riippumattoman teorian mukainen sitoutumisvakio K_r on 10010 ja kooperatiivisen teorian mukainen sitoutumisvakio amiiniryhmää kohti K_{ko} on 9395. Vastaavat sitoutumisvakiot pH-arvolla 5,2 MES-HEPES puskurissa ovat 5263 ja 6533. Pienillä N/P-arvoilla MES-HEPES puskureissa kooperatiivinen sitoutumisvakio amiiniryhmää kohden on siis lähes sama kuin riippumaton sitoutumisvakio. Tulokset ovat loogisia, sillä peptidimolekyyli on pieni DNA:han nähden, jolloin pienillä N/P-suhteilla sitoutuminen noudattaa ideaalista riippumatonta teoriaa.

Kokonaissitoutumisvakiossa näkyy kooperatiivisella alueella eri pH-arvoilla kolmen kertaluokan ero suuremmilla N/P-suhteilla. MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 7,4 kokonaissitoutumisvakio $(K_{ko})^\alpha$ on $1,67 \times 10^7$, kun se pH-arvolla 5,2 on jopa $2,29 \times 10^{10}$. Kun pH laskee, suurempi osuus peptidin amiiniryhmistä on protonoituneena, mikä selittää peptidin suuremman sitoutumisvakion pienemmällä pH-arvolla. Vastaavia

tuloksia on saatu myös polymeerejä tutkittaessa. Ketola (2014, s. 33–34) esittää, että haaroittuneella polyetyleni-imiinillä (BPEI) ja linearisella polyetyleni-imiinillä (LPEI) kokonaissitoutumisvakiot ovat suuremmat alhaisemmillä pH-arvoilla.

Myös kooperatiivisuuden aste α on suurempi happamammissa liuoksissa. MES-HEPES puskurissa pH-arvolla 5,2 kooperatiivisuuden aste on 2,9 ja pH-arvolla 7,4 se on 2,03. Ketolan (2014, s. 33–34) tutkimuksen mukaan vastaava havaitaan myös polymeereillä. BPEI:n kooperatiivisuuden aste on 3,8 pH-arvolla 5,2 ja 1,4 pH-arvolla 9,2. LPEI:llä vastaavasti 3,2 ja 1,6.

Asetaattipuskurissa sitoutuminen on N/P-arvoilla 0,4–3,0 positiivisesti kooperatiivista, sillä kooperatiivinen kerroin α on 2,57. Asetaattipuskurissa peptidin ja DNA:n sitoutumisen kokonaissitoutumisvakio (K_{ko}) ^{α} on $7,54 \times 10^9$. Kahta eri puskuria samassa pH-arvossa (5,2) verrattaessa huomataan selvä ero sitoutumisessa. Asetaattipuskurissa sitoutumisella ei ole lainkaan riippumatonta vaihetta. Sitoutumisero voi johtua puskurien erilaisista ionivahvuuksista. MES-HEPES puskurin ionivahvuus on 0,106 M pH-arvolla 5,2 ja 0,138 M pH-arvolla 7,4, kun taas NaAc-puskurin ionivahvuus on 0,019 M. Veren pH-arvo on 7,4 ja ionivahvuus 0,160 M (Siggaard-Andersen et al. 1984, s. 587, 591), jolloin MES-HEPES puskuri pH-arvolla 7,4 vastaa lähes veren ominaisuuksia myös ionivahvuuden osalta. Näin ollen voidaan todeta, että laboratoriotutkimukset puskuriliuoksissa ovat ympäristöltään *in vivo* -olosuhteita vastaavat.

Partikkelikokomittaukset eivät vastanneet hypoteesia, sillä suurin partikkelikoko pH-arvolla 7,4 saatiin N/P-suhteella 2. Oletettavaa olisi, että pH-arvolla 7,4 suurimmat partikkelikoot olisivat N/P-suhteella 8,0, jolloin lähes kaikki DNA:n fosforiryhmät ovat sitoutuneet, mutta amiiniryhmiä ei ole ylimäärin. Plank et al. (1999, s. 325) osoittivat tutkimuksessaan, että pH-arvolla 7,3 DNA:n ja peptidin (KK)₂KGGC kompleksin koko on 277 ± 140 nm. Mittauksissa saatiin DNA-peptidipartikkelin hydrodynaamisen halkaisijan keskiarvoksi noin 1000 nm N/P-suhteella 26,0 pH-arvolla 7,4, mutta kokoja-kauma oli kuitenkin hyvin polydispersinen. Partikkelikoko vaikutti kuitenkin laskevan peptidiylimäärän funktiona, joten partikkelikokomittausten suunta oli tässä mielessä oikea.

Partikkelikokomittauksista saatiin tietoa, jonka perusteella voidaan vertailla partikkelikokoja eri puskureissa. NaAc puskurissa partikkelien koko pieneni alhaisemmillä N/P-suhteilla ja näytteiden Pdi-arvot olivat pienempiä kuin MES-HEPES puskureissa. Tutkimuksen (Pelisek 2006, s. 186) mukaan puskurin ionivahvuus vaikuttaa partikkelikokoon, sillä suurempi ionivahvuus aiheuttaa DNA-peptidikompleksin aggregoitumista, eli kasautumista. MES-HEPES puskurien ionivahvuus oli suurempi kuin asetaattipuskurin, ja se näkyy partikkelikokomittauksissa partikkelikoon polydispersitetti-indeksin arvossa. Asetaattipuskurissa suuremmilla N/P-arvoilla näytteiden Pdi-arvot olivat pienempiä kuin vastaavissa MES-HEPES näytteissä.

Plankin mukaan (Plank, s. 325) transfektiokokeissa peptidi (KK)₂KGGC on tehokain N/P-suhteella 32. Partikkelikokomittauksissa huomattiin, että peptidiylimäärä vaikuttaa nanopartikkelin kokoon. On luultavaa, että peptidiylimäärä vaikuttaa suotuisasti transfektioon muun muassa partikkelikoon pienenemisen takia.

6 YHTEENVETO JA JOHTOPÄÄTÖKSET

Tämä diplomityö oli osa isompaa tutkimusprojektia, jossa tutkitaan erilaisten kationisten peptidien ja polymeerien käyttöä geeninsiirrossa. Tampereen teknillisellä yliopistolla keskitytään tutkimaan DNA-kompleksien muodostumista fluoresenssispektroskopian avulla. Tässä työssä tutkittiin peptidin $(KK)_2KGGC$ ja DNA:n sitoutumista. Fluoresoivana merkkiaineena käytetyn ETI:n fluoresenssin elin aika riippuu siitä, onko ETI vapaana vai interkaloitunut DNA:han. Kun DNA muodostaa nanopartikkelin peptidin kanssa, ETI irtaantuu DNA:sta, mikä havaitaan muuttuneena fluoresenssin elin ajana. DNA:n ja peptidin määrää näytteissä laskettiin peptidin aminoryhmien suhteena DNA:n fosfaattiryhmiin, eli N/P-suhteena.

Mittaukset suoritettiin kolmessa eri puskuriliuoksessa: MES-HEPES puskureissa pH-arvoilla 7,4 ja 5,2 sekä NaAc-puskurissa pH-arvolla 5,2. Happamammissa liuoksissa sitoutuneen DNA:n osuus saturoitui jo N/P-suhteilla 2,0–3,0, kun taas pH-arvolla 7,4 lähes kaikki DNA oli sitoutunut vasta N/P-suhteella 8,0. Partikkelikokomittauksissa huomattiin kompleksin suurenevan peptidilisäyksen funktiona, kunnes N/P-suhteen 3,0–4,0 jälkeen partikkelikoot jälleen pienenivät.

Työssä perehdyttiin kahteen tapaan mallintaa DNA-peptidipartikkelin muodostumista, riippumattomaan ja kooperatiiviseen teoriaan. Puskuriliuoksen pH:lla on vaikutusta polypleksien muodostumiseen. Kooperatiivisuusaste on korkeampi kuin pH-arvo on matalampi. Lisäksi sitoutumisvakio on suurempi pienemmällä pH-arvolla. MES-HEPES puskureissa kooperatiivisuuden luonne muuttuu lähes riippumattomasta kooperatiiviseksi N/P-suhteen 1,0–1,5 jälkeen, NaAc-puskurissa sitoutuminen puolestaan oli koko alueella kooperatiivista.

Jotta ympäristön olosuhteiden, kuten liuoksen ionivahvuuden vaikutusta DNA-kompleksien muodostumiseen ymmärrettäisiin paremmin, vastaavia kokeita voitaisiin tehdä esimerkiksi vakioimalla ionivahvuus eri pH-arvoissa natriumkloridin määrää muuttamalla. Tulevaisuudessa tulisi käyttää puskureita, jotka vastaisivat olosuhteiltaan mahdollisimman hyvin eläviä kudoksia, verta ja soluja.

Kationisten peptidien avulla tehtyä geeninsiirtoa on tutkittu soluissa transfektiokokeilla, mutta menetelmä on kallis ja hidas. Fluoresenssispektroskopian avulla voidaan tutkia geeninsiirron ensimmäistä vaihetta, DNA:n sitoutumista partikkeleiksi, huomattavasti nopeammalla ja edullisemmalla tavalla. Geeninsiirto on oleellinen osa geenihoidoja, joiden avulla voidaan hoitaa viiallisen geenin aiheuttamia sairauksia ja vaivoja. Geenihoidot ovat vielä kalliita ja tehottomia, sopivien kuljettaja-aineiden puuttuessa. Fluoresenssispektroskopian avulla mahdollisia kuljettaja-aineita on helppo ainakin karsia.

LÄHTEET

Byrne, C. D., & de Mello, A.J. 1998. Photophysics of ethidium bromide complexed to ct-DNA: a maximum entropy study. *Biophysical chemistry*, 70, 3, pp. 173-184.

Choosakoonkriang, S., Lobo, B. A., Koe, G. S., Koe, J. G., Middaugh, C. R. 2003. Biophysical Characterization of PEI/DNA Complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92, 8, pp. 1710-1722.

Dai, Z.; Gjetting, T.; Matthebjerg, M. A.; Wu, C.; Andresen, T. L. 2011. Elucidating the Interplay Between DNA-Condensing and Free Polycations in Gene Transfection Through a Mechanistic Study of Linear and Branched PEI. *Biomaterials*, 32, pp. 8626-8634.

Dean, J.A. Lange's Handbook of Chemistry Section 8. Electrolytes, Electromotive Force, and Chemical Equilibrium. 15. painos. 1999 New York, McGraw-Hill INC.

Engel, T., Reid, P. 2006. *Physical Chemistry*. 3rd edition. Pearson Education, Inc. 1061 p.

Engel, T., Drobny, G., Reid, P. 2008. *Physichal Chemistry for the life sciences*. International edition. Pearson Education, Inc. 792 p.

Fitzgerald-Hayes, M. & Reichsman, F. 2009. *DNA and Biotechnology*. 3rd Edition edn. Elsevier, pp. 243-264.

Hanzlíková, M.; Ruponen, M.; Galli, E.; Raasmaja, A.; Aseyev, V.; Tenhu, H.; Urtti, A.; Yliperttula, M. 2011. Mechanisms of Polyethylenimine-Mediated DNA Delivery: Free Carrier Helps to Overcome the Barrier of Cell-Surface Glycosaminoglycans. *J. Gene Med.*, 13, pp. 402-409.

Hashimoto, T., & Yamaoka, T. 2005. Polymeric Gene Carriers. In: K. Taira, K. Kataoka and T. Niidome, eds, Springer Tokyo, pp. 35-50.

Ikonen, M., Murtomäki, L., Kontturi, K. 2008. Controlled complexation of plasmid DNA with cationic polymers: Effect of surfactant on the complexation and stability of the complexes. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 66, pp. 77-83.

Ketola, T-M., Hanzlíková, M., Urtti, A., Lemmetyinen, H., Yliperttula, M., Vuorimaa, E. 2011. Role of Polyplex Intermediate Species on Gene Transfer Efficiency: Polyethylenimine–DNA Complexes and Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry* 115, pp. 1895-1902.

Ketola, T-M. C. Binding Affinity and Mechanism of polymer-DNA Polyplexes for Gene Delivery. Dissertation. Tampere 2014. Tampereen teknillinen yliopisto. Julkaisu – Tampere University of Technology. Publication 1187. 64 p.

Kobayashi, N., Nishikawa, M., & Takakura, Y. 2005; 2005. Gene Therapy and Gene Delivery. *Drug Delivery*. John Wiley & Sons, Inc., pp. 305-319.

Lee, P., & Huang, L. 2007. Nonviral Vector Systems. In: K. HUNT, S. VORBURGER and S. SWISHER, eds, Humana Press, pp. 157-170.

Mahato, R. I., Monera, O. D., Smith, L. C., Rolland, A. 1999. Peptide-based gene delivery. *Current Opinion in Molecular Therapeutics*. 1, 2, pp. 226-243

Malvern Instruments Ltd. 2010. Zetasizer Auto Plate Sampler. [WWW]. [Viitattu 19.5.2014]. Saatavissa: <http://www.malvern.com/Assets/MRK1111.pdf>

Martin, M., & Rice, K. 2007. Peptide-guided gene delivery. *The AAPS Journal*, 9, 1, pp. E18-E29.

Parril, A. 1997. Amino Acid Structures. [WWW]. [Viitattu 20.5.2014]. Saatavissa: <http://www.cem.msu.edu/~cem252/sp97/ch24/ch24aa.html>

Pelisek, J., Gaedtke, L., DeRouchey, J., Walker, G. F., Nikol, S., Wagner, E. Optimized lipopolyplex formulations for gene transfer to human colon carcinoma cells under *in vitro* conditions. *The Journal of Gene Medicine* 8, pp. 186-197.

Plank, C., Tang, M. X., Wolfe, A. R., Szoka, F. C. jr. Branched Cationic Peptides for Gene Delivery: Role of Type and Number of Cationic Residues in Formation and *in Vitro* Activity of DNA Polyplexes. 1999. *Human Gene Therapy* 10, pp. 319-332.

Siggaard-Andersen, O., Durst, R. A., MAAS, A. H. J. 1984. Physicochemical quantities and units in clinical chemistry with special emphasis on activities and activity coefficients. *Pure & App. Chemistry* 56, 5, pp. 567-594.

Sigma-Aldrich Co. 2014. HEPES. [WWW]. [Viitattu 21.5.2014]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h4034?lang=fi®ion=FI>

Sigma-Aldrich Co. 2014. MES hydrate. [WWW]. [Viitattu 21.5.2014]. Saatavissa: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m2933?lang=fi®ion=FI>

Tang, M. X. & Szoka, F. C. 1997. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy*, 4, pp. 82 -832.

Tkachenko, N. V. 2006. *Optical Spectroscopy*. 1. painos. Amsterdam, Elsevier. 322 p.

Tinoco, I. J., Sauer, K., Wang, J. C., & Puglisi, J. D. 2001. *Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences*. 4 th edn. New Jersey: Prentice Hall. 696 p.

Valeur, B. 2002. *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Germany: Wiley-VCH. 381 p.

Vuorimaa, E., Urtti, A., , R.S., Lemmetyinen, H., & Yliperttula, M. 2008. Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy Reveals Functional Differences of Cationic Polymer-DNA Complexes. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 35, pp. 11695-11700.

Wagner, E. 1999. Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38, 3, pp. 279-289.

Wagner, E., & Kloeckner, J. 2005. Gene Delivery Using Polymer Therapeutics. In: R. SATCHI-FAINARO and R. DUNCAN, eds, Springer Berlin Heidelberg, pp. 135-173.

Zuber, G., Scherman, D. 2009. Supramolecular Complexes of DNA. *Nanoscience*, Part 1, pp. 101-128.

Zugates, G.T., Tedford, N. C., Zumbuehl, A., Jhunjhunwala, S., Kang, C. S., Griffith, L. G., Anderson, D. G. 2007. Gene Delivery Properties of End-Modified Poly(β -amino ester)s. *Bioconjugate chemistry*, 18, 6, pp. 1887-1896.

Zumdahl, S.S. 2002. *Chemical principles*. 4. painos. Boston, Houghton Mifflin Company. 1047 p.